

内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A の学習記憶を
主とした雄性ラット中枢神経機能に及ぼす影響についての研究

2013 年 12 月

長崎大学大学院生産科学研究科

桑原 李佳

目次

序論	1
----	---

第1章 BPA 周産期曝露が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

1. 実験材料および実験方法	
1.1 実験動物	3
1.2 使用薬物	4
1.3 行動観察	
1.3.1 MAZE test	4
1.3.2 Morris water maze test	6
1.3.3 Step-through passive avoidance test	8
1.3.4 Open-field test	9
1.3.5 Elevated plus-maze test	9
1.4 統計学的処理	10
1.5 実験スケジュール	11
2. 実験結果	
2.1 MAZE test	12
2.2 Morris water maze test	14
2.3 Step-through passive avoidance test	14
2.4 Open-field test	15
2.5 Elevated plus-maze test	17
3. 考察	19

第2章 成獣雄性ラットに対する BPA 経口投与が学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

1. 実験材料および実験方法	
1.1 実験動物	22
1.2 使用薬物	23
1.3 行動観察	
1.3.1 MAZE test	23
1.3.2 Morris water maze test	25
1.3.3 Step-through passive avoidance test	26
1.3.4 Open-field test	26
1.3.5 Elevated plus-maze test	26
1.4 統計学的処理	26

1.5	実験スケジュール	27
2.	実験結果	
2.1	MAZE test	28
2.2	Morris water maze test	31
2.3	Step-through passive avoidance test	31
2.4	Open-field test	32
2.5	Elevated plus-maze test	34
3.	考察	36

第3章 BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

1.	実験材料および実験方法	
1.1	実験動物	39
1.2	使用薬物	40
1.3	ガイドカニューレ植え込み手術	40
1.4	薬物微量注入	40
1.5	行動観察	
1.5.1	MAZE test	40
1.5.2	Step-through passive avoidance test	42
1.5.3	Open-field test	42
1.5.4	Elevated plus-maze test	42
1.6	統計学的処理	42
1.7	実験スケジュール	43
2.	実験結果	
2.1	MAZE test	44
2.2	Step-through passive avoidance test	45
2.3	Open-field test	46
2.4	Elevated plus-maze test	48
3.	考察	50

総括	52
----	----

参考文献	54
------	----

謝辞	59
----	----

序論

生体内では、生体の内外で起こるさまざまな変化に対応してホメオスタシスを維持するために、多くのホルモンがさまざまな役割を持って機能している。環境中にはこれらの内因性ホルモンの作用を模倣あるいは阻害する天然物や合成化学物質が多く存在しており、内分泌攪乱化学物質と呼ばれている。

ポリカーボネート樹脂およびエポキシ樹脂などのプラスチックの原料として使用されているビスフェノール A (BPA) は、哺乳瓶、歯科用シーラントおよび食品用容器の内面塗装などにも用いられており、身近な内分泌攪乱化学物質の一つである。熱や pH の変化により BPA がこれらのプラスチック製品から溶出することが分かっており ¹⁾、実際に BPA はヒトの血液 ²⁾、尿 ³⁾ および母乳 ⁴⁾ など検出されている。このことから、ヒトが日常的に BPA に曝露されている可能性が示唆される。

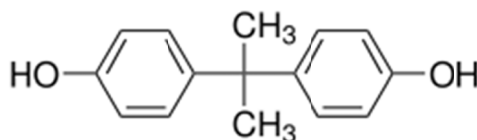


Fig. 1. Bisphenol A.

BPA は非常に弱いエストロゲン活性および抗アンドロゲン活性を有することが明らかになっており ⁵⁾、BPA の生殖系への影響に関しては多くの研究が行われている。BPA 周産期曝露は、雌性マウスにおいて生殖能力の用量依存的な低下を引き起こし ⁶⁾、雄性マウスにおいては生殖器官重量を変化させ、一日あたりの精子産生量を減少させたこと ⁷⁾ が報告されている。また、ラットにおいては、出生前の BPA 曝露が乳腺の組織構造を変化させ ⁸⁾、周産期の BPA 曝露が精巣内テストステロン濃度を低下させたこと ⁹⁾ が分かっている。一方で、BPA 周産期曝露がラットの性的発達および生殖機能に悪影響を及ぼさなかったという報告 ^{10, 11, 12)} もあり、BPA の生殖系への影響については一貫性に乏しい。

エストロゲンはげっ歯類において学習記憶能を向上させることが明らかにされており ^{13, 14, 15, 16)}、エストロゲン活性を有する BPA の中枢神経系への影響に関しても多くの報告がある。ラットへの低用量 BPA 周産期曝露は、行動における性差を消失させ、脳幹の青斑核の体積における性差を逆転させた ¹⁷⁾。また、マウスにおいても、青年期から若齢成獣期の長期間にわたる低用量 BPA 曝露が、探索行動、不安様行動および空間学習記憶能における性差を消失させた ¹⁸⁾。さらに、BPA 周産期曝露はラット ^{19, 20)} およびマウス ²¹⁾ において空間学習記憶能を低下させたことや、ラットにおいて多動性および注意力の欠如を引き起こしたこと ²²⁾ が明らかにされている。しかし、これらの報告とは対照的に、幅広い用量の BPA を周産期曝露されたラットにおいて、神経行動学的および神経病理学的変化が観察されなかったという報告 ²³⁾ もあり、BPA 周産期曝露の中枢神経系への影響に関してはさらなる議

論の余地がある。そこで、本研究では、BPA 周産期曝露が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について結論を得るべく、各種行動実験を用いて詳細に評価し、その結果を本論文の第 1 章で述べた。

BPA の中枢神経系への影響を調べた研究のほとんどは発達期間の曝露による影響を調べており、成獣動物に直接 BPA 曝露を行いその中枢神経系への影響を調べた研究は少ない。BPA 単回投与は、卵巣摘出 (OVX) ラットにおいて視覚的記憶固定および空間記憶固定に影響を及ぼさなかった²⁴⁾が、成獣雄性ラットにおいて視覚的記憶固定および空間記憶固定を低下させ、海馬の CA1 および内側前頭前皮質における樹状突起スパイン密度を減少させた²⁵⁾という報告がある。一方で、BPA 単回投与が雄性ラットにおいて受動回避記憶を向上させたという報告もある²⁶⁾。このように、成獣ラットへの BPA 投与が学習記憶に及ぼす影響について調べた数少ない研究結果は一貫性に欠けている。そこで、本研究では、成獣雄性ラットに対する BPA 経口投与が学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて評価し、その結果を本論文の第 2 章で述べた。さらに、成獣雄性ラットにおける空間学習記憶能への BPA の影響評価を確実なものにするために、空間学習記憶に関与する脳領域である背側海馬へ BPA 微量注入を行い、成獣雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて検討し、その結果を本論文の第 3 章で述べた。

第 1 章

BPA 周産期曝露が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

本章では、中枢神経系の発達において重要な時期である胎児期および新生児期の胎盤經由および母乳經由での BPA 曝露が、成長後の雄性ラットの中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。周産期の中枢神経系の発達は、成長後の行動の決定に大きく関わっており、BPA 周産期曝露の中枢神経系への影響を調べた研究の多くは、BPA 周産期曝露が成長後の行動にさまざまな影響を及ぼす可能性を示唆しているが^{17, 18, 19, 20, 21, 22}、その研究結果は一貫性に欠けている。本実験は、BPA 周産期曝露の中枢神経機能、特に学習記憶能への影響に関する結論を得るために行った。

今回の実験で使用した用量は、ヒトにおける耐容一日摂取量 (TDI) である $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ およびその 10 倍の濃度である $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ とした。また、BPA 曝露の主な経路は経口摂取であると考えられるため、投与方法として経口投与を選択した。毎日 BPA を経口投与された母親の母乳中で BPA が検出されたこと²⁷や、妊娠ラットに経口投与された BPA が血液胎盤関門を通過し胎児に移行したこと²⁸を明らかにした報告がある。さらに、母親への BPA 単回静脈内投与後に、胎児の肝臓や血中と比べて脳内で高濃度の BPA が検出された²⁹という報告もある。よって、今回の実験では母親へ BPA を慢性的に経口投与したため、BPA は十分に仔の脳内に移行したものと推測できる。

BPA 周産期曝露の中枢神経機能への影響を検証するために、MAZE test および Morris water maze test を用いて空間学習記憶能を、Step-through passive avoidance test を用いて体験型学習記憶能を、Open-field test を用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus-maze test を用いて不安様行動を評価した。

1. 実験材料および実験方法

1.1 実験動物

実験には、妊娠 6 日目で購入した Sprague Dawley 系雌性ラット (SD ラット: (株)九動) とその雄性仔を用いた。母仔とも温度 $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、12 h/12 h 明暗サイクル (午前 7 時点灯) の動物飼育保管実験室内で、プラスチック製ケージ (縦: 42.0 cm×横: 25.0 cm×高さ: 18.5 cm) にて飼育した。体重増加に差が無いよう 3 群 (各群 4 匹) に群分けを行い、妊娠 16 日目まで 2 匹ずつ群飼育し、その後個別飼育した。母親には餌 (固形飼料 F2: 株式会社 船橋農場) と水 (水道水) は自由摂取させた。

仔ラットについては、出生後 3 日目に一腹あたり 10 匹に間引き調整し、出生後 20 日目に離乳、さらに 4 週齢で雌雄分別および 1 ケージあたり 2~4 匹の群飼育を行った。本実験では雄性ラットを用いるため、間引きの際は雄性仔ラットを優先的に残し、10 匹に不足分

を雌性ラットで補った。6週齢で、MAZE test に用いるラット（各群 12 匹）とそれ以外の行動実験に用いるラット（各群 12 匹）に分けた。このとき、各母親からの仔の数ができるだけ均等になるようにした。MAZE test で用いる雄性ラットについては、報酬に対するモチベーションを高めるために、6 週齢から給餌・給水制限（餌：約 12 g/匹/日、水：約 33.3 ml/匹/日）を開始した。また、過度の体重制限を避ける目的で、週に 1 度給餌・給水制限を緩和した。MAZE test 以外の行動実験に使用する雄性ラットについては、実験測定期間を除き、餌と水は自由摂取させた。

なお、本実験はすべて長崎大学動物実験規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物は、ビスフェノール A（Bisphenol A : BPA : 和光純薬工業株式会社）を使用した。

BPA は、エタノール（Ethanol : 和光純薬工業株式会社）に溶解させた後、corn oil に溶解させ、エタノール濃度が 1 %になるよう調製した。投与量は 50 µg/kg および 500 µg/kg とし、妊娠 10 日目から出産後 14 日目まで経口ゾンデにて 1 ml/kg の割合で 1 日 1 回経口投与を行った。対照群にはエタノール濃度が 1 %となるよう調製した corn oil (vehicle) のみを同様に投与した (Vehicle 群)。

なお、ストレスを回避する目的で、経口投与はハロタンによる軽度の麻酔をかけた後に行った。

1.3 行動観察

1.3.1 MAZE test

空間学習記憶能の測定には可変式迷路装置 (MAZE : Fig. 1-1) を用いた。

本装置は、90 cm×90 cm の正方形に 15 cm×15 cm の正方形が連結した底面となっており、高さは 50 cm、内面は白色である。縦×横：50 cm×15 cm、50 cm×30 cm、50 cm×45 cm、50 cm×60 cm の仕切り板を組み合わせることで 3 段階の難易度の MAZE [MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C)]を作成した。

装置の底面上 100 cm の高さに 100 W の白色光を 2 台設置し、装置内はくまなく一定の照度が維持されるように調節した。装置内壁上部 4 箇所形状の異なるシールを貼り、ゴールまでの道筋を記憶する目印として用いた。ゴールには報酬としてミルクを置いた。ミルクは、20 g のコンデンスミルク（雪印乳業株式会社）に 100 ml の水道水を加えたものとした。

MAZE test を行うにあたり、まず装置と報酬への「慣らし」を 7 週齢時に行った。次に、各 MAZE において、正解通路を学習記憶させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたって空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。

なお、本実験におけるトレーニングおよびテストでは、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、ゴールに到着してからは報酬を自由に摂取させ、ここまでする 1 trial

とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。

8 週齢時に MAZE (A) test、10 週齢時に MAZE (B) test、12 週齢時に MAZE (C) test をそれぞれ実施した。

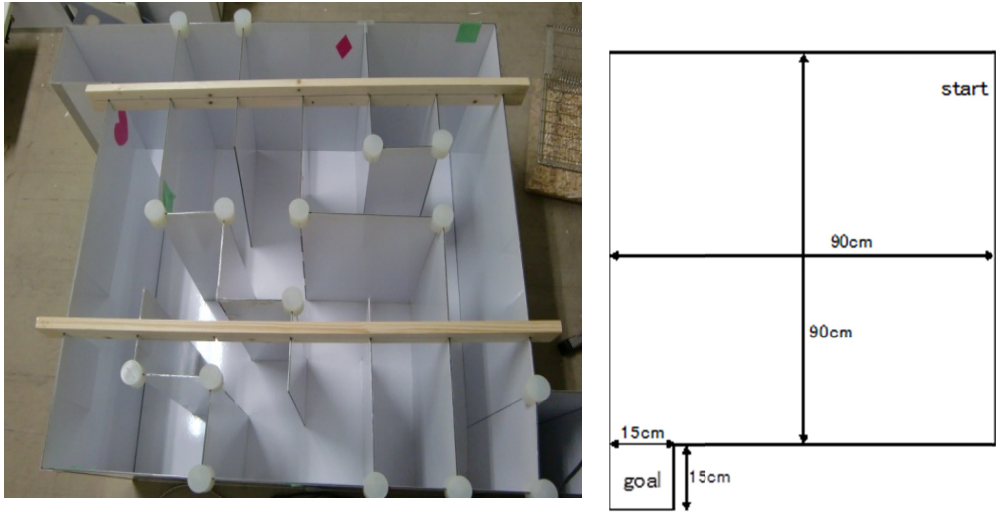


Fig. 1-1. Apparatus used for MAZE test.

① 慣らし

ゴールを塞いだ MAZE 装置を 4 等分に仕切り、1 エリアにつき 1 匹のラットを入れて慣らしを行った (Fig. 1-2)。1 trial を 3 分間とし、その間は装置内を自由に探索させた。報酬はミルク 300 μ l とした。3 trial を 1 session とし、2 時間の間隔をおいて 1 日に 2 session を、連続して 3 日間行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

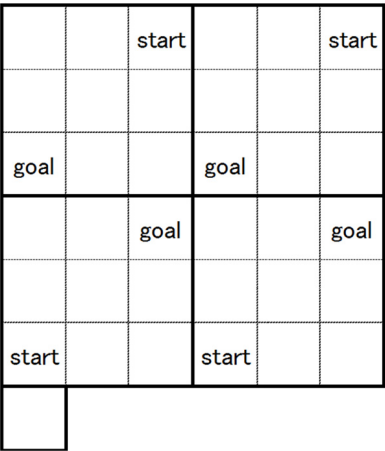


Fig. 1-2. Apparatus used for habituation to MAZE test.

② トレーニング

各 MAZE のエラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置を用いて、3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

③ テスト

各 MAZE 装置 (Fig. 1-3)を用いて、1 日 3 trial を連続して 3 日間行った。1 trial の最大測定時間を 5 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。5 分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) およびエラーエリアへの進入回数 (Error) とした。Error については、ラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

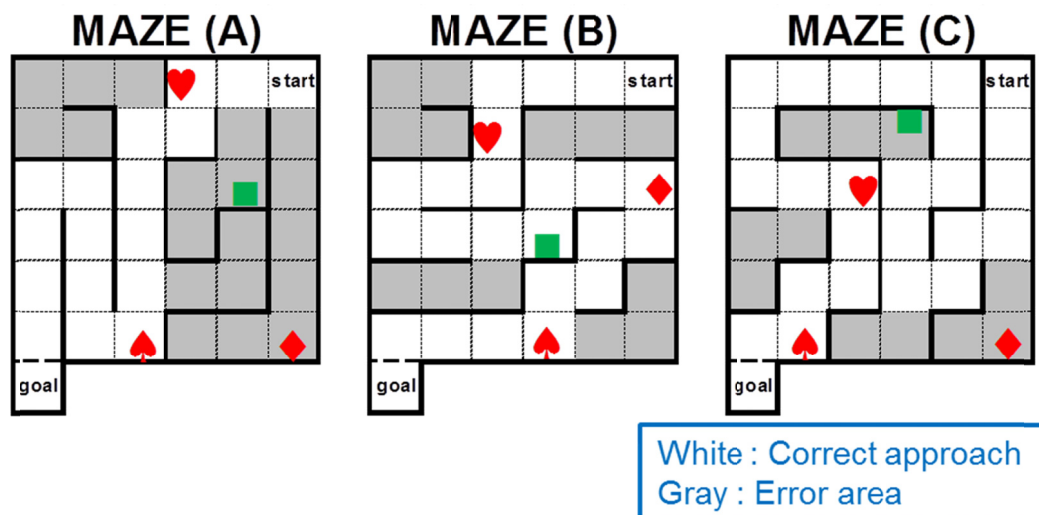


Fig. 1-3. MAZE apparatus. White and gray segments represent the correct approach and error areas, respectively. Four different marks placed on the walls show visual cues to remember the route to the goal compartment. Three types of MAZE with different levels of difficulty [MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C)] were used to assess spatial learning and memory of rats.

1.3.2 Morris water maze test

空間学習記憶能の測定は、MAZE test とは別にもう一つ Morris water maze を用いて行った。この課題では、動物は水難を回避するために周囲の環境条件を手がかりにして、自分の存在場所を認識し、回避できる目的地を探す。よって、この実験で動物の空間認知能力を測定することができる。

本装置は、直径 120 cm、深さ 55 cm の円筒の青色ポリエチレン製タンク（サミットタンク：サミット株式会社：Fig. 1-4）と直径 10 cm の透明なプラットフォームを用いた。タンクはプラットフォームが水面下 2 cm になるよう 22~24℃の水を高さ 29 cm まで満たし、

プラットフォームが入水したラットに見えないようにして、タンクの四分円のいずれかの中央に設置した。タンクの上位四方には色・形の異なる目印を貼りつけ、また、部屋の所々にも視覚的な目印を設置し、ラットがプラットフォームの位置を空間認識する手がかりになるようにした。

スタート地点はタンク壁面の 4 箇所の目印とし、いずれかの地点からタンク内壁面にラットの鼻部を向けて静かに水中に入れ、実験を開始した。実験開始から 60 秒を最大測定時間とし、ラットがプラットフォームにたどり着くまでの時間（Latency）を測定した。60 秒経過しても到着しない場合は、ラットを棒でプラットフォームまで誘導した。プラットフォームに乗った後 10 秒間はプラットフォーム上にラットを乗せておき、ここまですを 1 trial とした。1 trial が終了後、直ちにラットをプラットフォームからタオルを敷いたケージに移し、50 秒の間隔を置いて次の trial を開始した。

本実験では、短期間のみ保持される短期記憶を測定する working memory version で Water maze test を実施した。本実験に先立ち、「pre.テスト」を行い、その翌日から 3 日間にわたって「テスト」を行った。

本課題は、9 週齢時に行った。

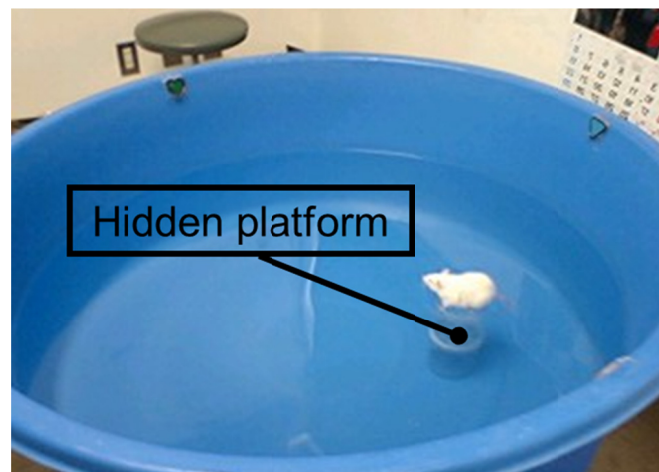


Fig. 1-4. Apparatus used for Morris water maze test.

① pre.テスト

まず、プラットフォーム上にラットを 60 秒間置いた。この際、プラットフォームはタンク中央に設置し、水面上 1 cm となるようにした。その 1 時間後、プラットフォーム上に目印として直径 5.5 cm の橙色のボールを取り付け、プラットフォームが水面下 2 cm となるように水面を上昇させ、プラットフォームをタンクのいずれかの四分円の中央に設置した。3 trial を 1 session として、2 時間の間隔をおいて 2 session を行った。なお、pre.テストの間、プラットフォームの位置やスタート地点は一定とした。

② テスト

1 日 3 trial を連続して 3 日間行った。3 回の連続した trial ではプラットフォームの位置、

スタート地点は一定とし、日ごとにどちらもランダムに変更した。

1.3.3 Step-through passive avoidance test

体験型学習記憶能の測定には、step-through 装置 (Fig. 1-5) を用いた。

本装置は、暗室 (30×30×30 cm) と明室 (10×20×12 cm) の 2 室で構成され、その間には仕切りにより開閉することができる通路 (8×8cm) がある。床面には電気刺激を与えるための金属グリッドが敷かれている。

本実験は連続して 3 日間行われた。1 日目に実験装置に慣らし、2 日目に獲得試行、3 日目に保持試行を行った。

正常なラットは電気ショックを不快に感じ、それを学習記憶するため、電気ショックを受けた暗室へはなかなか入ろうとはしなくなる。したがって、暗室に移動するまでの時間を測定することにより、そのラットの体験型学習記憶能を評価する。

本課題は、11 週齢時に行った。

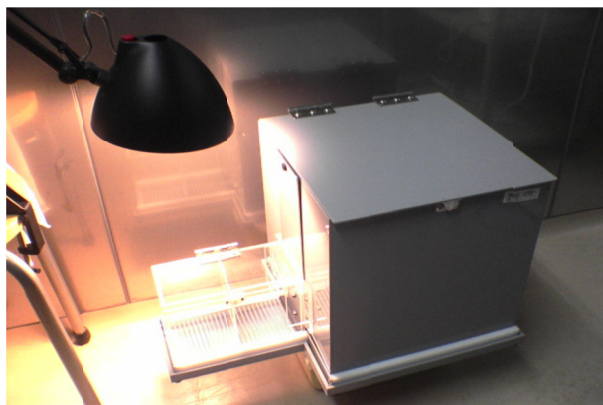


Fig. 1-5. Apparatus used for Step-through passive avoidance test.

① 慣らし

明室にラットを 1 匹ずつ入れ、10 秒後に仕切りを開け、その後 1 分半装置内を自由に探索させた。測定項目は、最初に暗室へ移動するまでの時間 (Latency) とした。

② 獲得試行

明室にラットを 1 匹ずつ入れ、10 秒後に仕切りを開けた。ラットは前日の慣らしの効果と暗い場所を好む性質のため、暗室に入ろうとする。ラットが暗室に入るとすぐに仕切りを閉め、5 秒間 1 mA の電流を流し、フットショックを与えた。最大測定時間を 5 分間とし、暗室へ移動するまでの時間 (Latency) を測定した。

③ 保持試行

明室にラットを 1 匹ずつ入れ、10 秒後に仕切りを開けた。最大測定時間を 5 分間とし、暗室へ移動するまでの時間 (Latency) を測定した。なお、動物が暗室に移動してもフットシ

ヨックは与えなかった。

1.3.4 Open-field test

一般活動性および情動性の測定には Hall の Open field 装置 (Fig. 1-6) を用いた。

本装置は底面の直径 60 cm、壁の高さ 50 cm、壁の上縁の直径 80 cm のバケツ状で、内面は灰白色である。底面には黒線が引かれ、ほぼ等面積の 19 区画に分割されている。装置の底面中央上 80 cm の高さに 100 W の白色光を設置し、装置内はくまなく一定の照度が保たれるようにした。本装置床面中央にラットを静かに置き、3 分間における Ambulation (locomotor activity: 自発運動量)、Inner、Rearing (立ち上がり運動) および脱糞・放尿回数を測定した。Ambulation は装置底面の区画を横切る総回数、Inner は内円の各区画を横切る回数をもって表した。なお、Ambulation は一般活動性、Inner は警戒行動、Rearing は探索行動の指標となる。インターバルを 2 時間として、1 日に 3 回 (初回、2 時間値、4 時間値) 測定した。

本課題は、7 週齢時に行った。

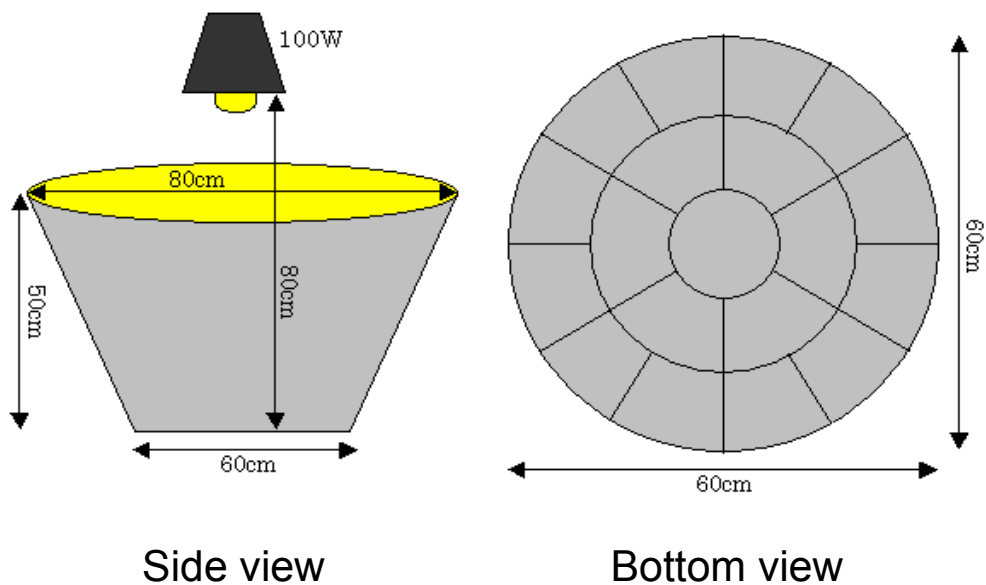


Fig. 1-6. Apparatus used for Open-field test.

1.3.5 Elevated plus-maze test

情動性の測定には高架式十字迷路装置 (Fig. 1-7) を用いた。

高架式十字迷路は床から 60 cm の高さに正方形のニュートラルゾーン (14×14 cm) があり、そこから 2 本の open arm と 2 本の closed arm が十字に伸びた装置で、黒いプラスチックで作られている。open arm は長さ 50 cm、幅 10 cm のアームで、closed arm は長さ 50 cm、幅 10 cm、周囲を高さ 60 cm の板で囲まれたアームである。2 本の open arm と 2 本の closed arm は、それぞれ向かい合っている。

ラットの頭が open arm の方向に向くようにしてニュートラルゾーンに乗せ、open arm

および closed arm における進入回数および滞在時間を 5 分間測定した。

危険察知能力のあるラットであれば避けると考えられる高所で壁のない open arm への進入回数および滞在時間を不安の尺度とし、open arm への進入回数が多いほどあるいは滞在時間が長いほど不安感が低下していると考えられる。

本課題は、7 週齢時に行った。

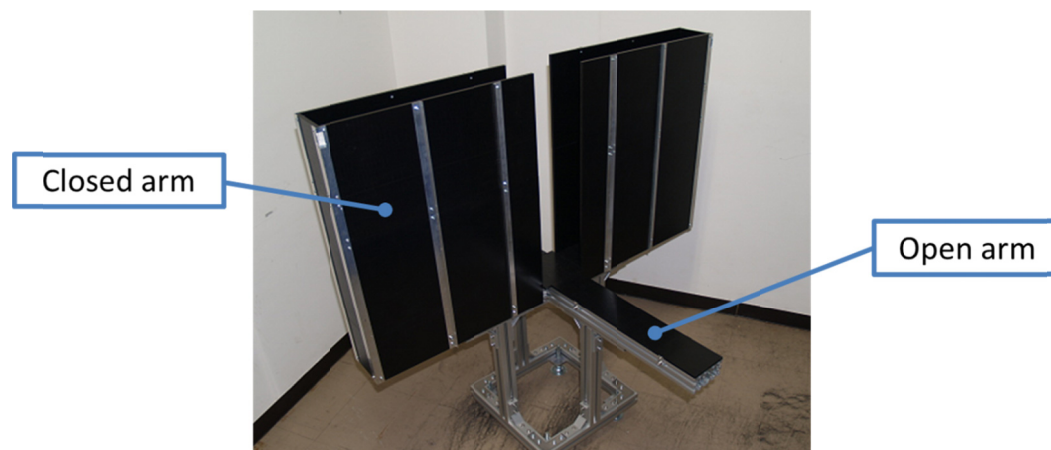


Fig. 1-7. Apparatus used for Elevated plus-maze test.

1.4 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。それぞれのテストから得たデータの有意差検定は、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行った後、Dunnett (Stat View 5.0, Microsoft) の多重比較検定を用いて行い、危険率 5 %以下を有意差有りとした。

1.5 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

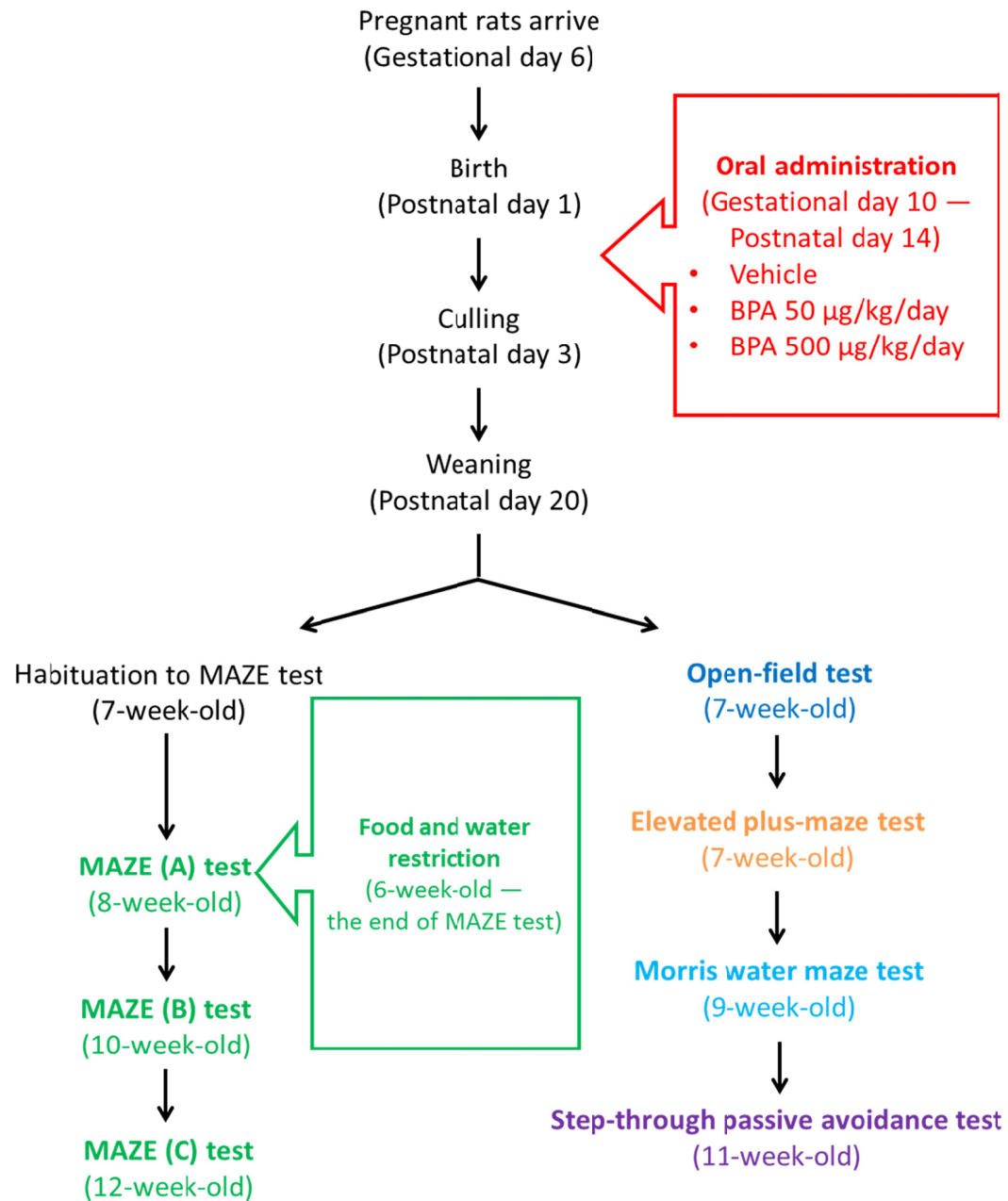


Fig. 1-8. Experimental procedure.

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 1-9, Fig. 1-10 は、周産期に BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および vehicle を曝露された雄性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 1-9)および Error (Fig. 1-10)をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。

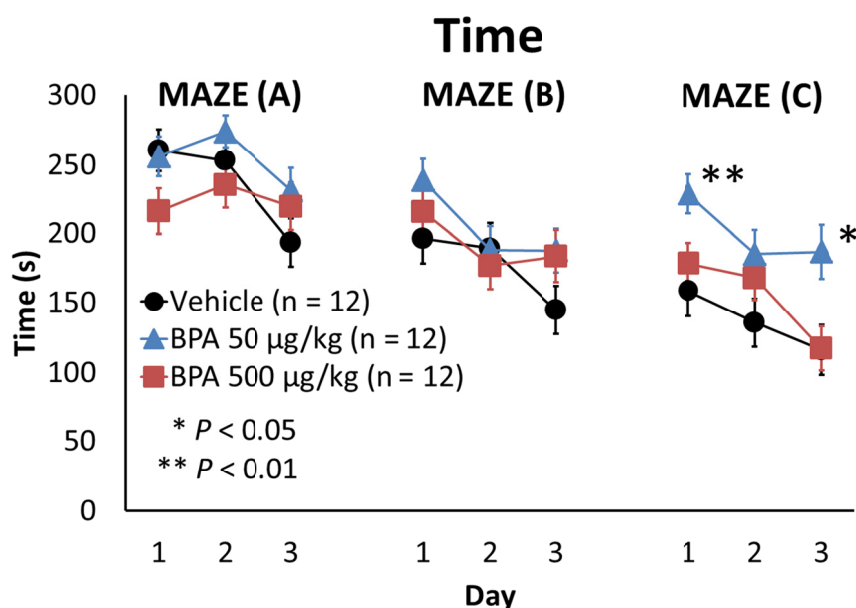


Fig. 1-9. Effect of perinatal BPA exposure on Time, defined as the latency required to reach the goal and start eating the reward, in MAZE test in 8-, 10-, and 12-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. $n = 12$ per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ indicate significant differences from control rats.

MAZE (A) test、MAZE (B) test および MAZE (C) test において、Vehicle 群の Time はそれぞれ日数の経過とともに短縮した。

MAZE (A) test において、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Time は 2 日目にやや増加し 3 日目に減少した。2 日目および 3 日目の BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の値は Vehicle 群よりやや高かったが、有意差は認められなかった。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Time は 3 日間ほとんど変化しなかった。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群は 1 日目および 2 日目に Vehicle 群より低い値を、3 日目に Vehicle 群より高い値を示したが、有意差は認められなかった。

MAZE (B) test において、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Time は 2 日目に減少し、3 日目はほとんど変化しなかった。BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群とも

に 1 日目および 3 日目に Vehicle 群より高い値を示したが、有意差は認められなかった。

MAZE (C) test において、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Time は 2 日目に減少し 3 日目はほとんど変化しなかった。3 日間 Vehicle 群より高い値で推移し、1 日目 ($P < 0.01$)および 3 日目 ($P < 0.05$)に有意差が認められた。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Time は日数の経過とともに短縮し、1 日目および 2 日目に Vehicle 群と比べてやや高い値を示したものの有意差は見られなかった。

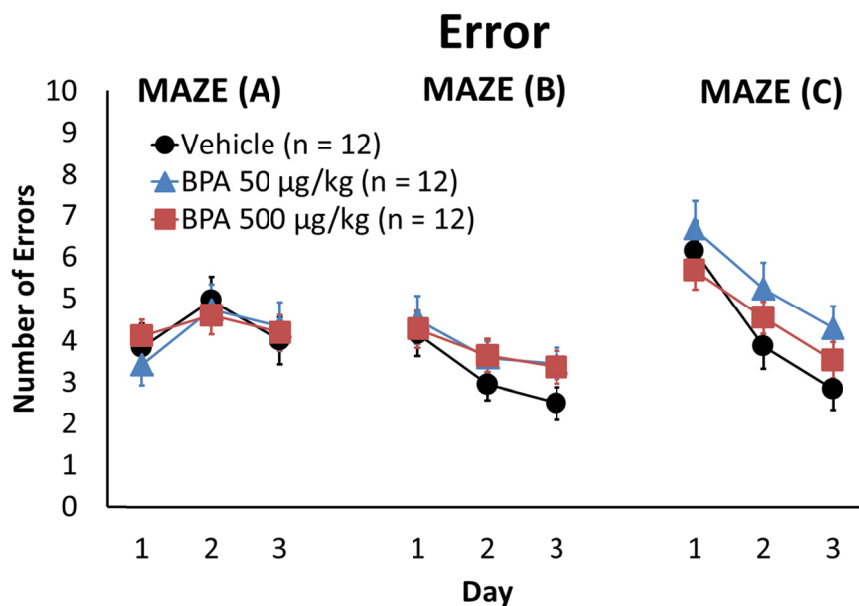


Fig. 1-10. Effect of perinatal BPA exposure on Error, defined as the number of times the rats entered the error area, in MAZE test in 8-, 10-, and 12-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. $n = 12$ per group.

MAZE (A) test において、Vehicle 群の Error は 2 日目に増加し 3 日目に減少した。BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Error は Vehicle 群とほぼ同様に推移し、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Error は 3 日間ほとんど変化しなかった。いずれの群も Vehicle 群との間に有意差は認められなかった。

MAZE (B) test において、すべての群の Error は日数の経過とともに減少した。BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Error は 2 日目および 3 日目に Vehicle 群と比べてわずかに高い値を示したが、有意差は認められなかった。

MAZE (C) test において、すべての群の Error は日数の経過とともに減少した。BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群は 3 日間 Vehicle 群より高い値を示し、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群も 2 日目および 3 日目に Vehicle 群よりやや高い値を示したが、いずれの群も Vehicle 群との間に有意差は認められなかった。

2.2 Morris water maze test

Fig. 1-11 は、周産期に BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 、BPA 500 $\mu\text{g/kg}$ および vehicle を曝露された雄性ラットの Morris water maze test における日ごとの Latency をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Latency はスタートしてからプラットフォームに到着するまでの時間である。

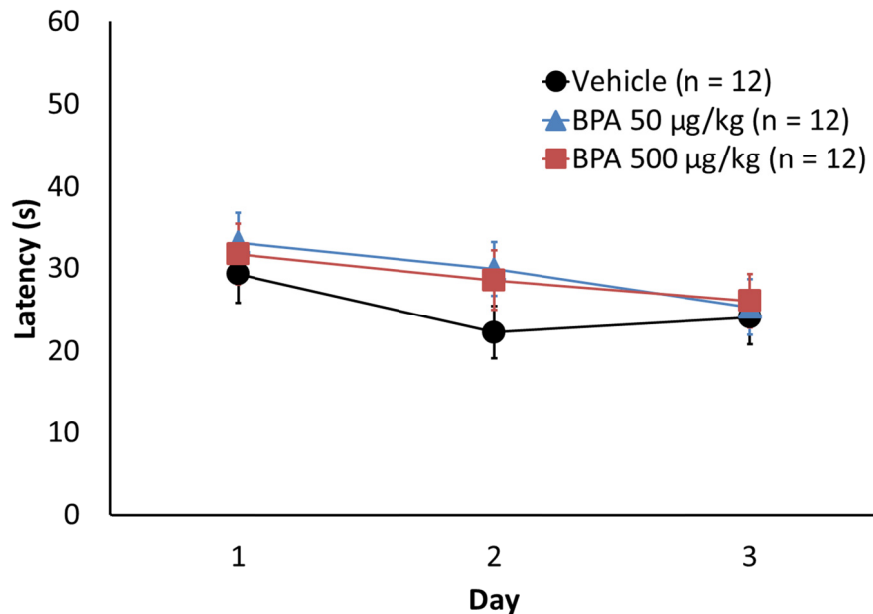


Fig. 1-11. Effect of perinatal BPA exposure on Latency to find the platform in Morris water maze test in 9-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. n = 12 per group.

Vehicle 群の Latency は 2 日目にやや減少したが、3 日目にやや増加した。BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g/kg}$ 群の Latency は日数の経過とともに短縮し、いずれの群も 2 日目に Vehicle 群より長い Latency を示したが、有意差は認められなかった。

2.3 Step-through passive avoidance test

Fig. 1-12 は、周産期に BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 、BPA 500 $\mu\text{g/kg}$ および vehicle を曝露された雄性ラットの Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行における Latency をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。

獲得試行において、BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g/kg}$ 群の Latency は Vehicle 群より長く、BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 群と Vehicle 群の間には有意差が認められた ($P < 0.05$)。保持試行の Latency については、BPA 50 $\mu\text{g/kg}$ 群は Vehicle 群よりやや長く、BPA 500 $\mu\text{g/kg}$ 群は Vehicle 群よりやや短かったが、いずれも有意なものではなかった。

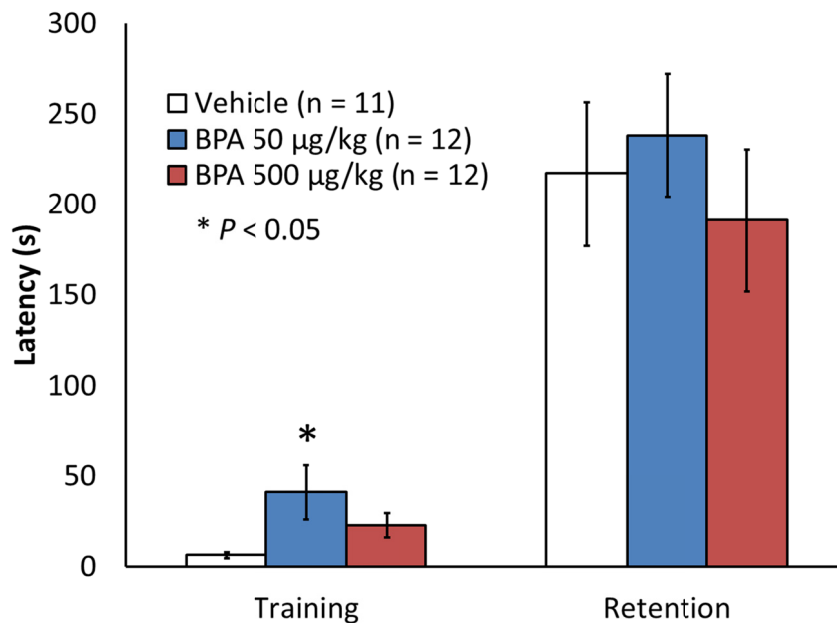


Fig. 1-12. Effect of perinatal BPA exposure on Latency to enter the dark chamber in Step-through passive avoidance test in 11-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls: $n = 11$; BPA groups: $n = 12$ each. * $P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

2.4 Open-field test

Fig. 1-13～Fig. 1-15 は、周産期に BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および vehicle を曝露された雄性ラットの open-field test における Ambulation (Fig. 1-13)、Rearing (Fig. 1-14)、Inner (Fig. 1-15)をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Rearing は立ち上がり行動の回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数である。

Vehicle 群の Ambulation は時間経過とともに減少したが、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Ambulation は実験中ほとんど変化せず、Vehicle 群との間に有意差は見られなかった。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Ambulation は Vehicle 群と同様に時間経過とともに減少し、実験中常に Vehicle 群より高い値で推移したが、Vehicle 群との間に有意差は認められなかった。

Vehicle 群の Rearing は時間経過とともに減少したが、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Rearing は 2 時間値で減少し 4 時間値でやや増加した。BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の 2 時間値は Vehicle 群よりやや低い値であったが、有意差は認められなかった。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Rearing は Vehicle 群と同様に時間経過とともにわずかに減少し、実験中常に Vehicle 群より高い値で推移したが、Vehicle 群との間に有意差は認められなかった。

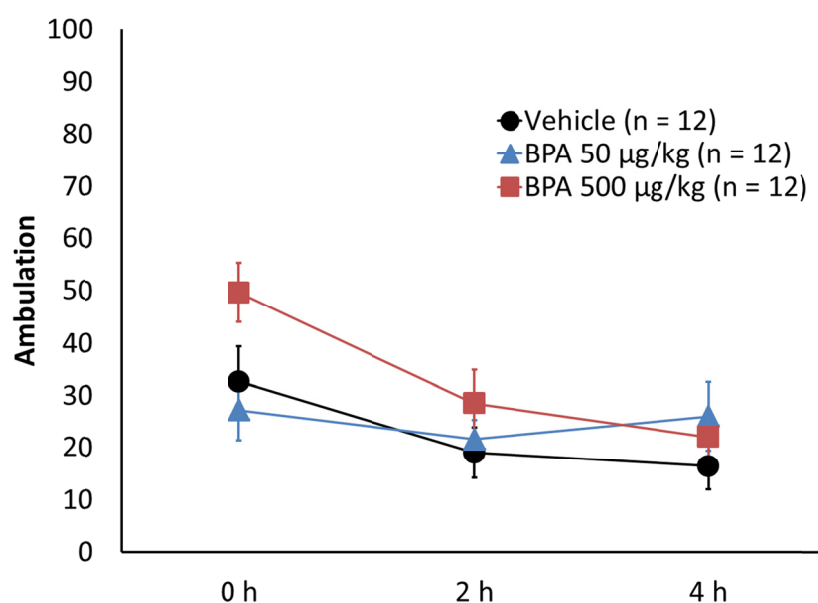


Fig. 1-13. Effect of perinatal BPA exposure on Ambulation (the total number of crossings) during Open-field test in 7-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. $n = 12$ per group. * $P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

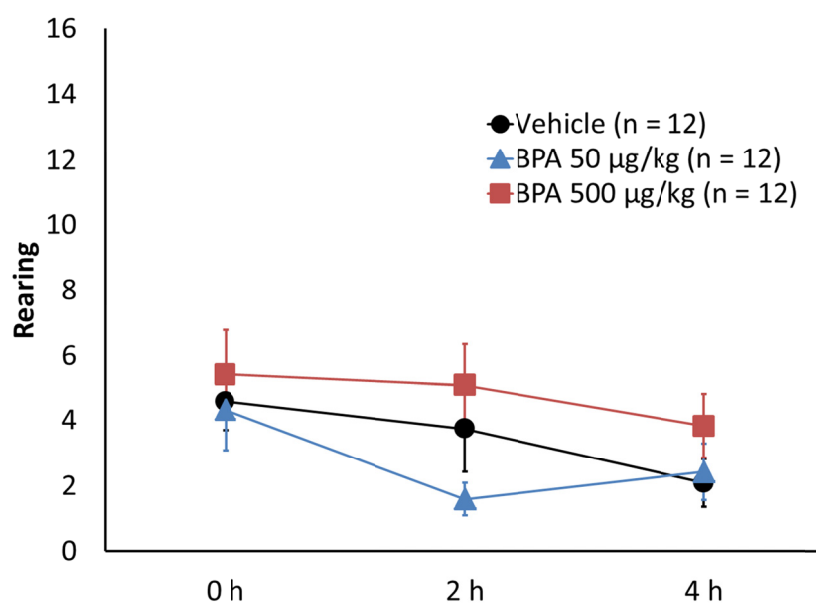


Fig. 1-14. Effect of perinatal BPA exposure on Rearing (frequency of rearing) during Open-field test in 7-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. $n = 12$ per group.

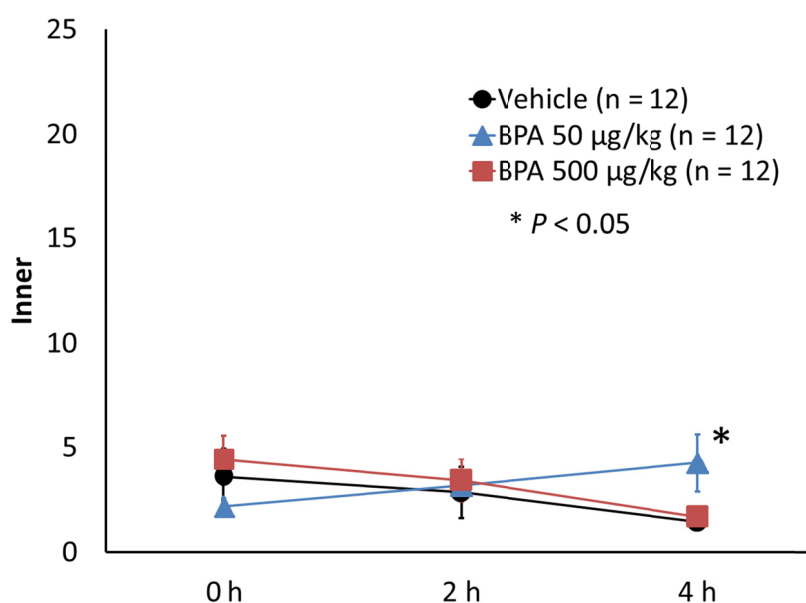


Fig. 1-15. Effect of perinatal BPA exposure on Inner (the number of crossings inside the inner circle) during Open-field test in 7-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. $n = 12$ per group. $*P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

Vehicle 群の Inner は時間経過とともに減少した。一方、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Inner は時間経過とともに増加し、4 時間値は Vehicle 群より有意に高い値となった ($P < 0.05$)。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の Inner は Vehicle 群とほぼ同様の値で推移し、有意差は認められなかった。

2.5 Elevated plus-maze test

Fig. 1-16, Fig. 1-17 は、周産期に BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および vehicle を曝露された雄性ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 (Fig. 1-16) および滞在時間 (Fig. 1-17) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。

BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の open arm および closed arm への進入回数は Vehicle 群とほぼ同様の値で、有意差は見られなかった。BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の open arm および closed arm への進入回数は Vehicle 群と比べてわずかに増加したが、有意差は認められなかった。

open arm における滞在時間に関しては、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ともに Vehicle 群との間に有意差は認められなかった。closed arm における滞在時間は Vehicle 群と比べて、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群においてやや短く、BPA 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群においてやや長かったが、有意差は認められなかった。

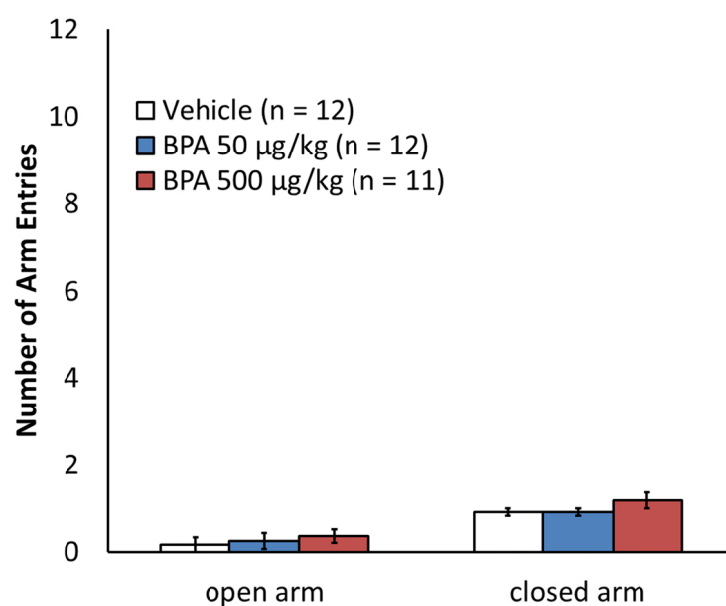


Fig. 1-16. Effect of perinatal BPA exposure on number of arm entries in Elevated plus-maze test in 7-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ BPA group: n = 12 each; 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ BPA group: n = 11.

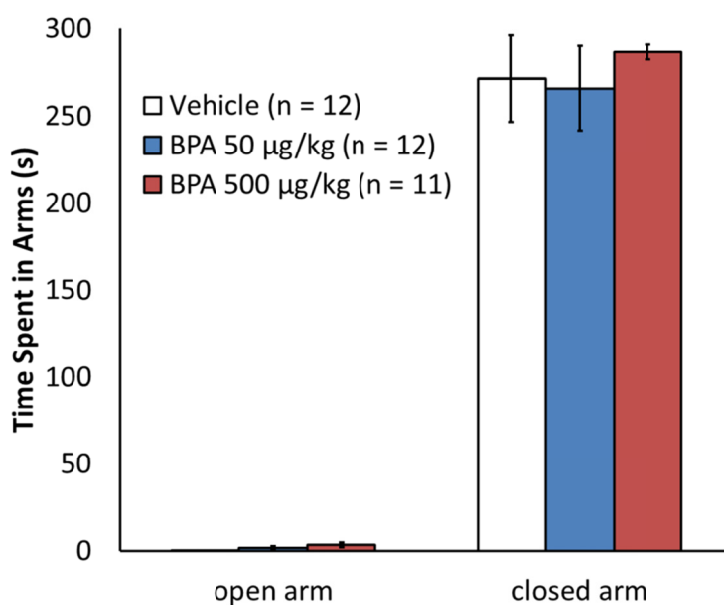


Fig. 1-17. Effect of perinatal BPA exposure on time spent in arms in Elevated plus-maze test in 7-week-old male rat offspring. Mother rats were treated with oral administration of BPA (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$) or vehicle from GD 10 to PND 14. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ BPA group: n = 12 each; 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}/\text{day}$ BPA group: n = 11.

3. 考察

本研究では、中枢神経系の発達に重要な時期である胎児期および新生児期の BPA 曝露が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて評価した。

BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響を評価するために、難易度が徐々に高くなる 3 種類の MAZE を用いた MAZE test を行った。MAZE test では、ラットは装置内の目印を手掛かりとしてゴールまでの道筋を学習記憶し、実験を重ねるうちに次第にスムーズにゴールできるようになる。よって、Time の短縮および Error の減少は空間学習記憶能の向上を示す。

Vehicle 群の Time は各 MAZE test 内で日数の経過とともに短縮し、右下がりの学習曲線が得られた (Fig. 1-9)。さらに、MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C) と MAZE の難易度が上昇しても、Vehicle 群は MAZE test が進むにつれて Time を短縮させた。一方、BPA 50 µg/kg 群は、Vehicle 群で見られたような MAZE test の進行に伴う Time の短縮を示さなかった。このため、MAZE (C) test において、BPA 50 µg/kg 群の Time は Vehicle 群よりも有意に高い値となった (Day 1: $P < 0.01$; Day 3: $P < 0.05$; Fig. 1-9)。このことから、BPA 50 µg/kg 周産期曝露は雄性ラットの空間学習記憶能を低下させることが示唆された。さらに、MAZE test 後期の MAZE (C) test を行うまで BPA 50 µg/kg 群と Vehicle 群の Time に有意差は観察されなかったことから、低用量 BPA 周産期曝露による雄性ラットの空間学習記憶能低下を評価するためには、本研究で使用された MAZE test のような長期間にわたって行う一連の学習記憶試験が必要とされる可能性がある。

高用量の BPA に周産期曝露された BPA 500 µg/kg 群は、MAZE test の Time および Error において Vehicle 群と比べて有意な変化を示さず、高用量 BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 1-9, Fig. 1-10)。

BPA 周産期曝露が雄性ラットの一般活動性および情動性へ及ぼす影響を評価するために、Open-field test を用いて新奇環境におけるラットの行動を観察した。ラットを open field 装置に入れると、装置の壁面に沿って注意深く行動する習性があり、装置中央部における探索行動は少ない。したがって、通常状態においては、Inner よりも Ambulation から Inner を引いた値の方が大きい。しかし、ラットの探索行動が増加し、情動性が低下すると、Inner や Rearing の値が増加する。これは、動物の警戒心が薄れ、新奇環境における不安や恐怖による行動抑制が緩和されることによるものである。また、BPA 周産期曝露が雄性ラットの情動性へ及ぼす影響の評価に関しては、Elevated plus-maze test も使用した。open arm における進入回数および滞在時間が高所に対する不安や恐怖などの情動性の指標となり、open arm への進入回数が多いほどあるいは滞在時間が長いほど不安感が低下していると考えられる。また、closed arm への進入回数は活動性の指標として考えることができる。

Open-field test における Vehicle 群の Ambulation および Inner は、新奇環境への慣れにより、時間の経過とともに減少した (Fig. 1-13, Fig. 1-15)。対照的に、BPA 50 µg/kg 群

の Ambulation は Open-field test の間ほとんど変化しなかった (Fig. 1-13)。さらに、BPA 50 µg/kg 群の Inner は時間の経過とともに徐々に増加し、4 時間値は Vehicle 群より有意に高い値となった ($P < 0.05$; Fig. 1-15)。この慣れの消失が、MAZE test における BPA 50 µg/kg 群の空間学習記憶能低下の要因の 1 つである可能性がある。一方で、Open-field test における自発運動量および Elevated plus-maze test における情動性に関しては BPA 50 µg/kg 周産期曝露による影響が認められなかったため、MAZE test で観察された BPA 50 µg/kg 群の空間学習記憶能低下は単なる活動性や情動性の差によりもたらされたものではないことが示唆される。

Open-field test において BPA 500 µg/kg 群の Ambulation および Rearing は Vehicle 群と比べてやや増加し (Fig. 1-13, Fig. 1-14)、Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数も Vehicle 群と比べてわずかに増加した (Fig. 1-16)。よって、BPA 500 µg/kg 周産期曝露が雄性ラットの活動性をやや増加させる傾向があることが示唆され、この活動性の増加が BPA 500 µg/kg 群における空間学習記憶能低下をマスクした可能性も考えられる。

BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能へ及ぼす影響に関しては、MAZE test に加えて Morris water maze test を用いて評価した。Morris water maze test では、ラットは水難を回避することを目的として、最初は壁伝いに泳ぎ、徐々に中央の方へ泳ぎだし、最終的に回避用のプラットフォームを見つけるという行動をとる。しかし、実験を重ねると、周囲の手掛かりを基にプラットフォームの位置を学習記憶するようになるため、次第に壁伝いに泳ぐ時間が短くなり、やがてプラットフォームのある位置に向けてほぼ一直線に泳ぐようになる。よって、測定項目である Latency の短縮は空間学習記憶能の向上を示す。

Morris water maze test の Latency に関して、BPA 50 µg/kg 群および BPA 500 µg/kg 群は Vehicle 群との間に有意差を示さず、BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 1-11)。この結果は、BPA 周産期曝露がげっ歯類の空間学習記憶能に影響を及ぼさないというこれまでの報告^{23, 30)}とは一致しているが、低用量 BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させることを示唆する本研究の MAZE test の結果とは異なるものであった。MAZE test と Morris water maze test の結果において異なる評価が生じた要因の 1 つは、行動目的の違いであると考えられる。MAZE test におけるモチベーションはゴールの報酬を得ることであるが、Morris water maze test におけるモチベーションは水難を回避することである。報酬学習と忌避学習には異なるドーパミン神経経路が関与していることが報告されている³¹⁾。さらに、我々は MAZE test により Reference memory を測定したが、Morris water maze test により Working memory を測定した。これらの 2 つの記憶のタイプに関与する脳領域は異なり、Spatial reference memory には海馬が、Spatial working memory には前頭前皮質が関与している³²⁾。BPA 周産期曝露は、海馬においてシナプス構造修飾³³⁾およびセロトニン神経系³⁴⁾を変化させることが明らかにされている。よって、BPA 周産期曝露は海馬依存的な Spatial reference

memory に特異的に影響を及ぼす可能性がある。

MAZE test の結果は、雄性ラットの空間学習記憶能における BPA 周産期曝露の影響が用量依存的ではないことを示唆する。ホルモンや内分泌攪乱化学物質は、U 字型や逆 U 字型のような非単調な用量反応関係を示す傾向があることが分かっている^{36, 37, 38, 39, 40)}。BPA に関しても、高用量ではなく低用量の BPA が、新生児期曝露により雌性ラットの思春期の到来を早めたことを明らかにした報告⁴¹⁾や、胎児期曝露により雄性マウスの肝臓重量や血中インスリン濃度を増加させたという報告⁴²⁾があり、高用量ではなく低用量の BPA への周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させたという我々の結果はこれらの報告と一致している。この空間学習記憶能と BPA 周産期曝露の非単調用量反応関係の要因としては、低用量 BPA と高用量 BPA の受容体選択性の違いが考えられる。BPA は、低用量の場合にはほとんどエストロゲン受容体だけに結合するが、高用量の場合にはアンドロゲン受容体や甲状腺ホルモン受容体にも結合することが報告されている⁴³⁾。この BPA の性質が、MAZE test で観察された空間学習記憶能と BPA 周産期曝露の非単調用量反応関係に関与している可能性が考えられる。

Step-through passive avoidance test では、ラットが暗所を好むという性質を利用して、BPA 周産期曝露が雄性ラットの体験型学習記憶能へ及ぼす影響を評価した。ラットが明室から暗室へ移行した際に電気ショックを与えることにより恐怖体験を学習記憶させ（獲得試行）、その翌日に明室から暗室へ移行するまでの時間（Latency）を測定した（保持試行）。保持試行における Latency の短縮は、体験型学習記憶能の低下を示す。また、獲得試行における Latency は警戒心の指標となり、Latency が長いほど警戒心が強く働いていると考えられる。

獲得試行において BPA 50 µg/kg 群は Vehicle 群よりも有意に長い Latency ($P < 0.05$)を示したが、保持試行の Latency は BPA 周産期曝露により影響を及ぼされなかった (Fig. 1-12)。この結果は、BPA 50 µg/kg 周産期曝露が雄性ラットの警戒心を亢進させるが、BPA 周産期曝露は体験型学習記憶能には影響を及ぼさないことを示唆する。低用量 BPA 周産期曝露が雄性ラットの体験型学習記憶能を低下させたという報告²⁰⁾もあるが、我々の結果は BPA 周産期曝露が雄性マウス²¹⁾および雄性ラット³⁵⁾の体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことを示唆した報告を支持する。

したがって、本実験は、高用量ではなく低用量の BPA 周産期曝露が、成長後の雄性ラットにおいて、一般活動性に影響を及ぼすことなく、特異的に空間学習記憶能、特に海馬依存的な Spatial reference memory を低下させたことを示唆する。一方、体験型学習記憶能に関しては、空間学習記憶能で観察されたような BPA 周産期曝露による影響は認められなかった。

第 2 章

成獣雄性ラットに対する BPA 経口投与が 学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

本章では、成獣期の BPA 曝露が雄性ラットの中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。BPA の中枢神経系への影響を調べた研究のほとんどは発達期間の曝露による影響を調べており、成獣動物に直接 BPA 曝露を行いその中枢神経系への影響を調べた研究は少ない。第 1 章の実験結果は、BPA 周産期曝露が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させることを示唆した。よって、成獣期の BPA 曝露の影響を調べることで、BPA の神経毒性に脆弱な時期を特定できると考えられる。

今回の実験では、第 1 章の BPA 周産期曝露の中枢神経機能に及ぼす影響を調べた実験において雄性ラットの空間学習記憶能を低下させた用量であり、ヒトにおける TDI でもある 0.05 mg/kg、その 20 倍の濃度である 1 mg/kg および TDI の 200 倍と非常に高濃度の 10 mg/kg の用量を用いた。また、BPA 曝露の主な経路は経口摂取であると考えられるため、投与方法として経口投与を選択した。ラットへの BPA 200 mg/kg の単回経口投与は、投与 30 分後に血中濃度のピーク (1.6 ppm) を、投与後 60 分以内に脳内濃度のピーク (19.70 ppb) を示したことが報告されている⁴⁴⁾。さらに、*in vitro* の実験で 10 nM BPA が成獣ラットの海馬ニューロンにおいてスパイン形成に影響を及ぼしたことが分かっており⁴⁵⁾、経口摂取された BPA は血液脳関門を通過し、中枢神経系に影響を及ぼすものと推測される。

BPA 経口投与の中枢神経機能への影響を検証するために、MAZE test および Morris water maze test を用いて空間学習記憶能を、Step-through passive avoidance test を用いて体験型学習記憶能を、Open-field test を用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus-maze test を用いて不安様行動を評価した。なお、BPA 10 mg/kg の影響を検討する際には、BPA 経口投与の空間学習記憶能への影響をさらに詳細に評価するために、MAZE test に MAZE (D) test を追加して行った。

1. 実験材料および実験方法

1.1 実験動物

実験には、5 週齢で購入した Sprague Dawley 系雄性ラット (SD ラット：(株)九動) を用いた。温度 22 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 %、12 h/12 h 明暗サイクル (午前 7 時点灯) の動物飼育保管実験室内で、プラスチック製ケージ (縦：42.0 cm×横：25.0 cm×高さ：18.5 cm) にて 1 ケージあたり 2～3 匹の群飼育を行った。

入荷後 1 週間は餌 (固形飼料 F2：船橋農場株式会社) と水 (水道水) を自由摂取させ、その後は MAZE test の報酬に対するモチベーションを高めるため、給餌・給水制限 (餌：約 12 g/

匹/日、水：約 33.3 ml/匹/日)を行った。また、過度の体重制限を避けるため、週に 1 度、給餌・給水制限を緩和した。

各投与群間に MAZE test における走行能の差ができる限り生じないように、MAZE test の群分けトレーニングを用いて投与群の群分けを行った。

本実験は、すべて長崎大学実験動物規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物は、ビスフェノール A (Bisphenol A : BPA : 和光純薬工業株式会社) を使用した。

投与量は 0.05 mg/kg、1 mg/kg および 10 mg/kg とした。BPA は、エタノール (Ethanol : 和光純薬工業株式会社) に溶解させた後 corn oil に溶解させ、0.05 mg/kg 溶液および 1 mg/kg 溶液では エタノール濃度が 1 %に、10 mg/kg 溶液ではエタノール濃度が 9 %になるよう調製した。各用量を経口ゾンデにて 1 ml/kg の割合で経口投与し、BPA 0.05 mg/kg 投与群および BPA 1 mg/kg 投与群の対照群 (Vehicle L 群) にはエタノール濃度が 1 %となるよう調製した corn oil を、BPA 10 mg/kg 投与群の対照群 (Vehicle H 群) にはエタノール濃度が 9 %となるよう調製した corn oil をそれぞれ経口投与した。

なお、ストレスを回避する目的で、経口投与はハロタンによる軽度の麻酔をかけた後に行った。

1.3 行動観察

1.3.1 MAZE test

空間学習記憶能の測定には可変式迷路装置 (MAZE : Fig. 1-1) を用いた。

本装置は、90 cm×90 cm の正方形に 15 cm×15 cm の正方形が連結した底面となっており、高さは 50 cm、内面は白色である。縦×横：50 cm×15 cm、50 cm×30 cm、50 cm×45 cm、50 cm×60 cm の仕切り板を組み合わせて 4 段階の難易度の MAZE [MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C) → MAZE (D)]を作成した。

装置の底面上 100 cm の高さに 100 W の白色光を 2 台設置し、装置内はくまなく一定の照度が維持されるように調節した。装置内壁上部 4 箇所形状の異なったシールを貼り、ゴールまでの道筋を記憶する目印として用いた。ゴールには報酬としてミルクを置いた。ミルクは、20 g のコンデンスミルク (雪印乳業株式会社) に 100 ml の水道水を加えたものとした。

MAZE test を行うにあたり、まず装置と報酬への「慣らし」および「群分けトレーニング」を 7 週齢時に行った。次に、各 MAZE において、正解通路を学習記憶させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたって空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。

なお、本実験におけるトレーニングおよびテストでは、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、ゴールに到着してからは報酬を自由に摂取させ、ここまでする 1 trial

とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。

被験薬物の投与は、トレーニングおよびテスト後 30 分以内に行われた。

8 週齢時に MAZE (A) test、10 週齢時に MAZE (B) test、12 週齢時に MAZE (C) test、14 週齢時に MAZE (D) test をそれぞれ実施した。ただし、MAZE (D) test は、BPA 10 mg/kg 投与群およびその対照群のみに行った。

① 慣らし

ゴールを塞いだ MAZE 装置を 4 等分に仕切り、1 エリアにつき 1 匹のラットを入れて慣らしを行った (Fig. 1-2)。1 trial を 3 分間とし、その間は装置内を自由に探索させた。報酬はミルク 300 μ l とした。3 trial を 1 session とし、2 時間の間隔をおいて 1 日に 2 session を、連続して 3 日間行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

② 群分けトレーニング

エラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置 (Fig. 2-1) を用いて、3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールに到達できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールに到達し報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

この群分けトレーニングの結果を用いて、できる限り各投与群間で走行能の差が生じないよう群分けを行った。

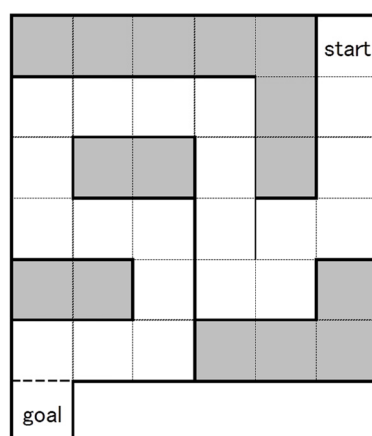


Fig. 2-1. Apparatus used for training to divide into treatment groups.

③ トレーニング

各 MAZE のエラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置を用いて、3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴー

ルの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

④ テスト

各 MAZE 装置 (Fig. 2-2)を用いて、1 日 3 trial を連続して 3 日間行った。1 trial の最大測定時間を 5 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。5 分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) およびエラーエリアへの進入回数 (Error) とした。Error については、ラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

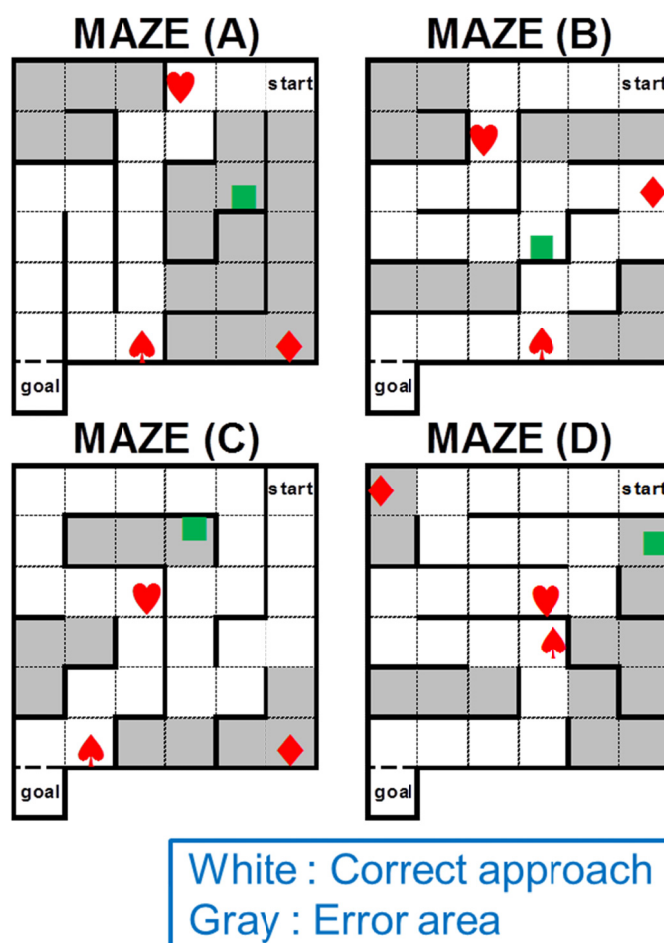


Fig. 2-2. MAZE apparatus. White and gray segments represent the correct approach and error areas, respectively. Four different marks placed on the walls show visual cues to remember the route to the goal compartment. Four types of MAZE with different levels of difficulty [MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C) → MAZE (D)] were used to assess spatial learning and memory of rats.

1.3.2 Morris water maze test

空間学習記憶能の測定には Morris water maze test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.2 Morris water maze test と同様である。本課題は 11 週齢時に

実施し、被験薬物の投与はテストの 30 分前に行った。

1.3.3 Step-through passive avoidance test

体験型学習記憶能の測定には Step-through passive avoidance test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.3 Step-through passive avoidance test と同様である。本課題は 13 週齢時に実施し、被験薬物の投与は獲得試行終了後 30 分以内に行った。

1.3.4 Open-field test

一般活動性および情動性の測定には Open-field test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.4 Open-field test と同様である。本課題は 8 週齢時に実施し、被験薬物の投与は Open-field test の前日に行った。

1.3.5 Elevated plus-maze test

情動性の測定には Elevated plus-maze test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.5 Elevated plus-maze test と同様である。本課題は 10 週齢時に実施し、被験薬物の投与は Elevated plus-maze test の前日に行った。

1.4 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。それぞれのテストから得たデータの有意差検定は、3 群間の比較については、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行った後、Dunnett (Stat View 5.0, Microsoft) の多重比較検定を用いて行った。2 群間の比較については、Student's *t*-test (Stat View 5.0, Microsoft) を用いて行った。危険率 5 %以下を有意差有りとした。

1.5 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

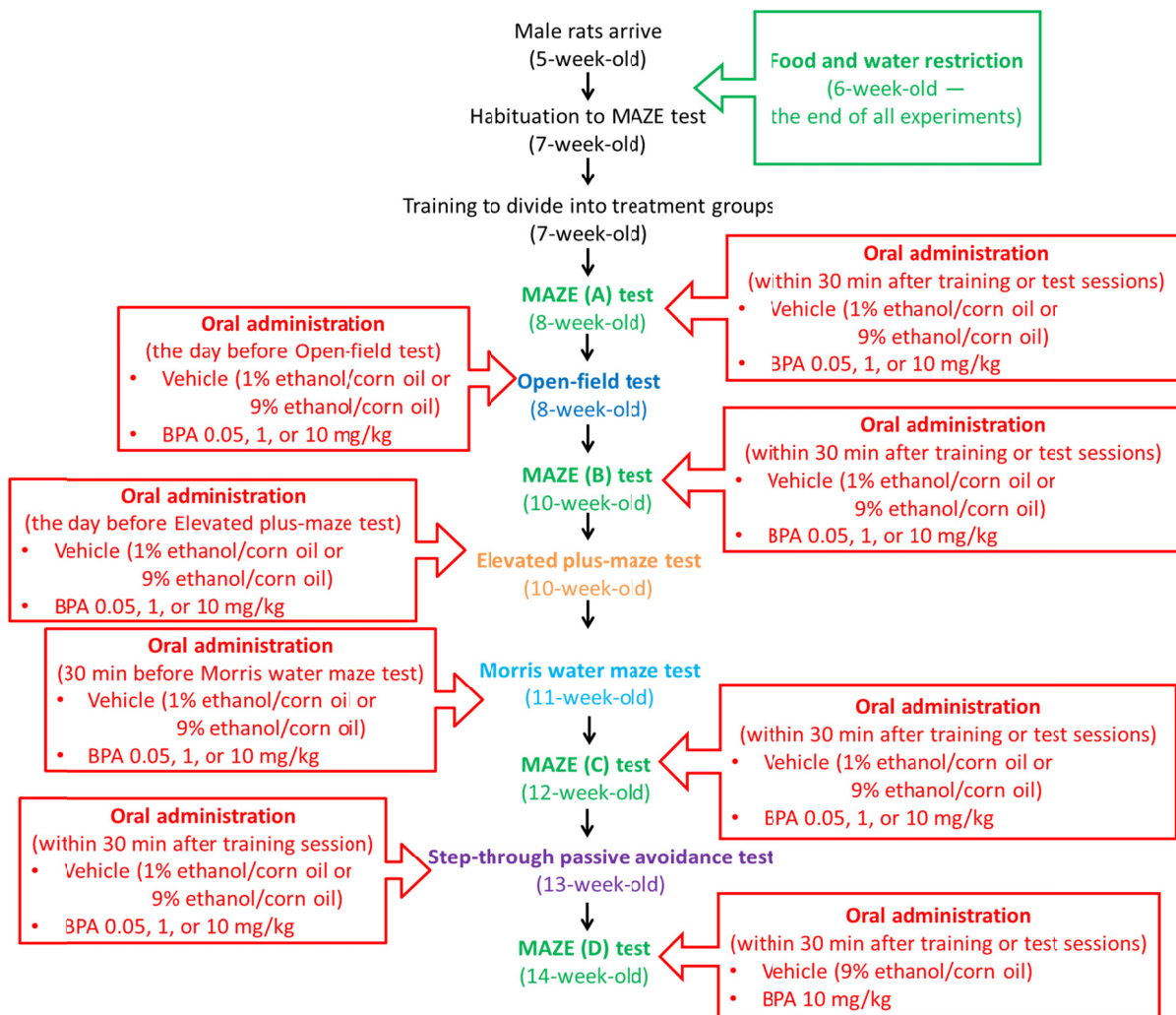


Fig. 2-3. Experimental procedure.

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 2-4, Fig. 2-5 は、BPA 0.05 mg/kg、BPA 1 mg/kg、BPA 10 mg/kg および vehicle (1% ethanol/corn oil あるいは 9% ethanol/corn oil) を経口投与された雄性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 2-4) および Error (Fig. 2-5) をその平均値±標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。

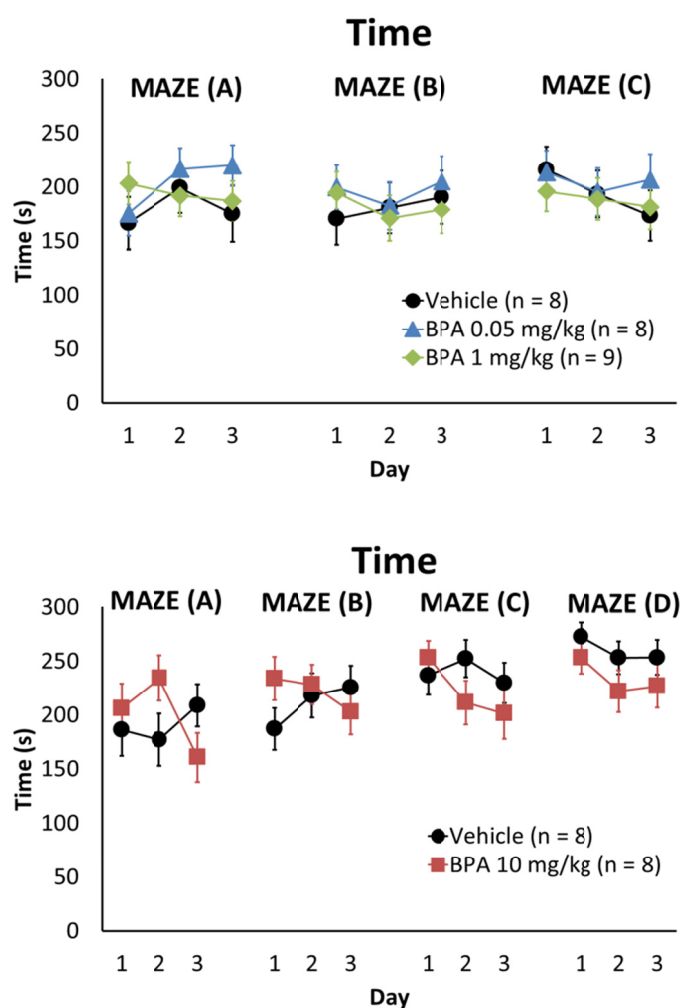


Fig. 2-4. Effect of oral BPA administration on Time, defined as the latency required to reach the goal and start eating the reward, in MAZE test in 8-, 10-, 12-, and 14-week-old male rats. MAZE (D) test was applied only to the 10 mg/kg BPA group and the vehicle control. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) within 30 min after training or test sessions. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: n = 8 each; 1 mg/kg BPA group: n = 9.

MAZE (A) test において、Vehicle L (1% ethanol/corn oil)群の Time は 2 日目に増加し 3 日目に減少した。BPA 0.05 mg/kg 群の Time は日数の経過とともに増加し、2 日目および 3 日目には Vehicle L 群よりやや高い値となったが、有意差は認められなかった。一方、BPA 1 mg/kg 群の Time は日数の経過とともに短縮した。1 日目には Vehicle L 群よりやや高い値を示したが、有意差は認められなかった。Vehicle H (9% ethanol/corn oil)群の Time は 2 日目にわずかに短縮し、3 日目に増加した。BPA 10 mg/kg 群の Time は 2 日目に増加し、Vehicle H 群と比べて長い傾向 ($P < 0.1$)が認められた。しかし、3 日目には Time が短縮し、Vehicle H 群より低い値となったが、有意差は見られなかった。

MAZE (B) test において、Vehicle L 群および Vehicle H 群の Time は日数の経過とともに増加した。BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の Time は 2 日目にやや減少し、3 日目にやや増加した。いずれの群も 1 日目に Vehicle L 群よりやや高い値を示したが、有意差は見られなかった。BPA 10 mg/kg 群の Time は 1 日目に Vehicle H 群より長い傾向 ($P < 0.1$)が認められたが、日数の経過とともに短縮し、Vehicle H 群との間に有意差は認められなかった。

MAZE (C) test において、Vehicle L 群の Time は日数の経過とともに短縮した。BPA 0.05 mg/kg 群の Time は 2 日目にやや減少し、3 日目にやや増加した。3 日目に Vehicle L 群よりやや高い値を示したが、有意差は見られなかった。BPA 1 mg/kg 群の Time は 3 日間ほとんど変化せず、1 日目に Vehicle L 群よりわずかに低い値を示したが、有意差は認められなかった。Vehicle H 群の Time は 2 日目にやや増加し、3 日目にやや減少した。BPA 10 mg/kg 群の Time は日数の経過とともに短縮し、2 日目および 3 日目に Vehicle H 群よりやや低い値となったが、有意差は認められなかった。

MAZE (D) test において、Vehicle H 群の Time は 2 日目に短縮し、その後はほとんど変化しなかった。BPA 10 mg/kg 群の Time は 3 日間 Vehicle H 群よりやや低い値で推移したが、有意差は認められなかった。

Error に関しては、MAZE (A) test において、Vehicle L 群の Error は 2 日目に増加し、3 日目に減少した。BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の Error は 3 日間ほとんど変化せず、Vehicle L 群との間に有意差は認められなかった。Vehicle H 群の Error は 2 日目にやや減少し、3 日目にやや増加した。BPA 10 mg/kg 群の Error は 2 日目にやや増加して Vehicle H 群よりわずかに高い値となり、3 日目に減少して Vehicle H 群よりわずかに低い値となったが、いずれも有意差は見られなかった。

MAZE (B) test において、Vehicle L 群の Error は 3 日間ほとんど変化しなかった。BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の Error は日数の経過とともにわずかに減少したが、Vehicle L 群との間に有意差は認められなかった。Vehicle H 群および BPA 10 mg/kg 群の Error は日数の経過とともに減少した。BPA 10 mg/kg 群の Error は 3 日間常に Vehicle H 群より高い値で推移し、2 日目には有意差が認められた ($P < 0.05$)。

MAZE (C) test において、Vehicle L 群の Error は日数の経過とともに減少した。BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の Error は 3 日間ほとんど変化せず、Vehicle L 群との間

に有意差は認められなかった。Vehicle H 群の Error は 3 日間ほとんど変化しなかった。一方、BPA 10 mg/kg 群の Error は日数の経過とともに減少し、3 日目には Vehicle H 群より低い値を示す傾向 ($P < 0.1$) が認められた。

MAZE (D) test において、Vehicle H 群の Error は 3 日間ほとんど変化しなかった。BPA 10 mg/kg 群の Error は 3 日間常に Vehicle H 群より低い値で推移し、1 日目には Vehicle H 群より低い値を示す傾向 ($P < 0.1$) が、3 日目には Vehicle H 群との間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

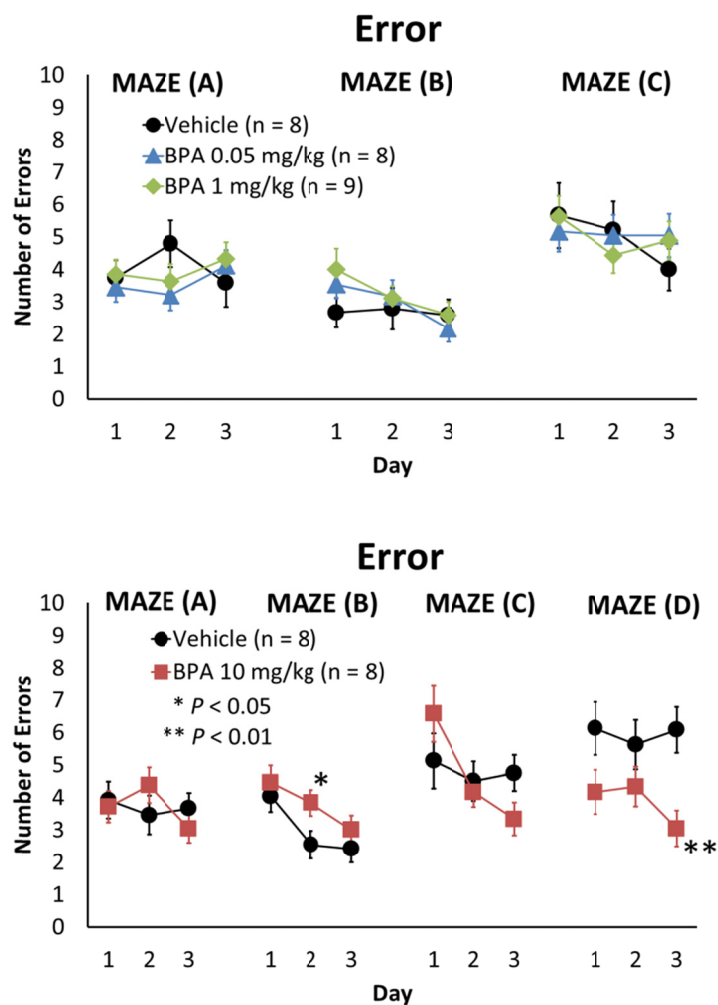


Fig. 2-5. Effect of oral BPA administration on Error, defined as the number of times the rats entered the error area, in MAZE test in 8-, 10-, 12-, and 14-week-old male rats. MAZE (D) test was applied only to the 10 mg/kg BPA group and the vehicle control. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) within 30 min after training or test sessions. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$. * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$ indicate significant differences from control rats.

2.2 Morris water maze test

Fig. 2-6 は、BPA 0.05 mg/kg、BPA 1 mg/kg、BPA 10 mg/kg および vehicle (1% ethanol/corn oil あるいは 9% ethanol/corn oil)を経口投与された雄性ラットの Morris water maze test における日ごとの Latency をその平均値±標準誤差で表したものである。Latency はスタートしてからプラットフォームに到着するまでの時間である。

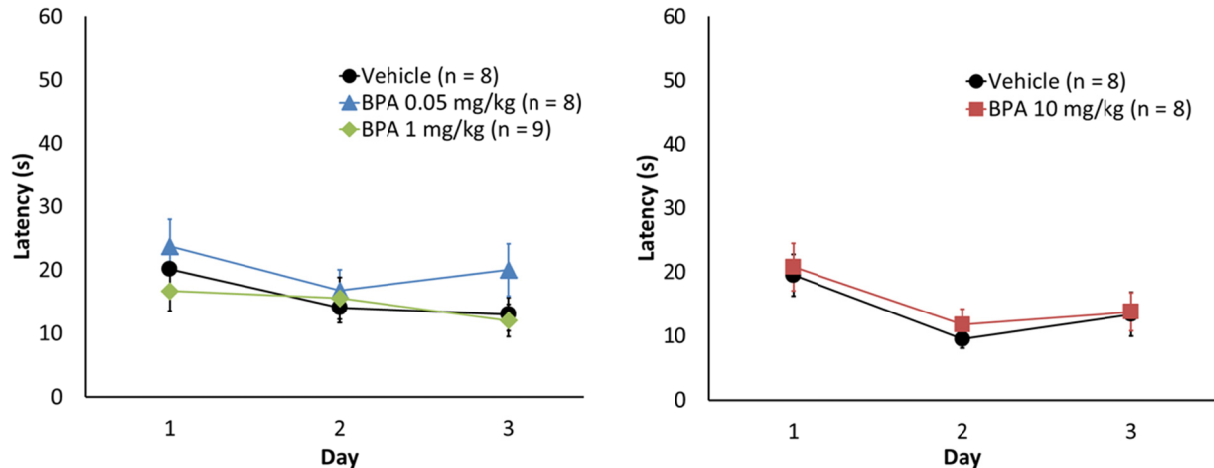


Fig. 2-6. Effect of oral BPA administration on Latency to find the platform in Morris water maze test in 11-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) 30 min before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: n = 8 each; 1 mg/kg BPA group: n = 9.

Vehicle L 群の Latency は日数の経過とともに緩やかに短縮した。BPA 0.05 mg/kg 群の Latency は 3 日間常に Vehicle L 群よりわずかに高い値で推移したが、有意差は認められなかった。BPA 1 mg/kg 群の Latency は 3 日間ほとんど変化せず、Vehicle L 群との間に有意差は認められなかった。

Vehicle H 群および BPA 10 mg/kg 群の Latency は 2 日目に短縮し、3 日目にやや長くなった。ほぼ同様の値で推移し、群間に有意差は認められなかった。

2.3 Step-through passive avoidance test

Fig. 2-7 は、BPA 0.05 mg/kg、BPA 1 mg/kg、BPA 10 mg/kg および vehicle (1% ethanol/corn oil あるいは 9% ethanol/corn oil)を経口投与された雄性ラットの Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行における Latency をその平均値±標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。

BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の獲得試行における Latency は Vehicle L 群とほぼ同じで、有意差は認められなかった。保持試行においては、BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の Latency は Vehicle L 群よりやや長かったが、有意差は見られなかった。

BPA 10 mg/kg 群の獲得試行における Latency は Vehicle H 群より長い傾向 ($P < 0.1$) が認められ、保持試行における Latency も Vehicle H 群よりやや長かったが、有意差は認められなかった。

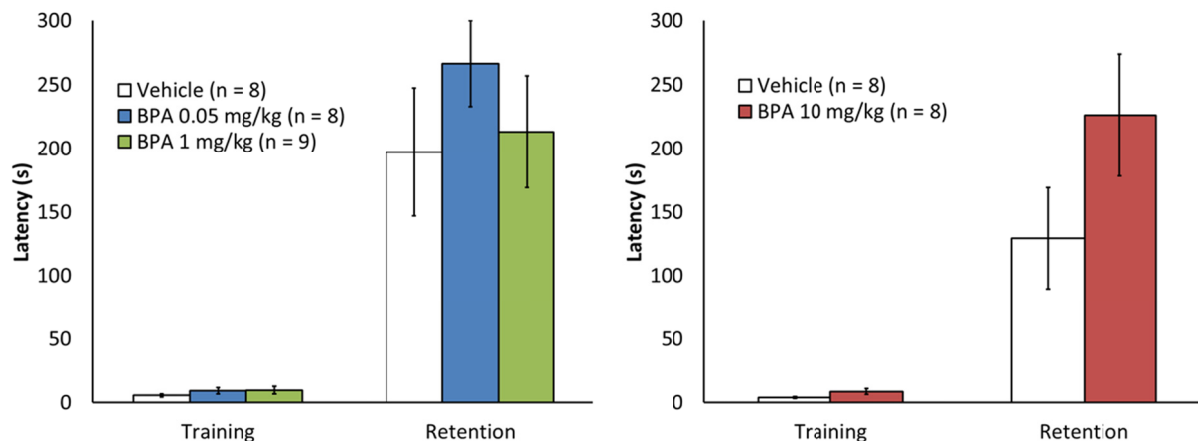


Fig. 2-7. Effect of oral BPA administration on Latency to enter the dark chamber in Step-through passive avoidance test in 13-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) within 30 min after the training session. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$.

2.4 Open-field test

Fig. 2-8～Fig. 2-10 は、BPA 0.05 mg/kg、BPA 1 mg/kg、BPA 10 mg/kg および vehicle (1% ethanol/corn oil あるいは 9% ethanol/corn oil) を経口投与された雄性ラットの open-field test における Ambulation (Fig. 2-8)、Rearing (Fig. 2-9)、Inner (Fig. 2-10) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Rearing は立ち上がり行動の回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数である。

Vehicle L 群および Vehicle H 群の Ambulation は時間経過とともに減少した。

BPA 0.05 mg/kg 群の Ambulation も時間の経過とともに緩やかに減少し、実験中常に Vehicle 群より低い値を示し、初回では Vehicle L 群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。BPA 1 mg/kg 群の Ambulation は 2 時間値で減少し、4 時間値で増加した。実験中常に Vehicle L 群より低い値で推移したが、有意差は認められなかった。

BPA 10 mg/kg 群の Ambulation は Vehicle H 群と同様に時間経過とともに減少し、Vehicle H 群との間に有意差は認められなかった。

Vehicle L 群の Rearing は 2 時間値でわずかに減少したが、その後はほとんど変化しなかった。BPA 0.05 mg/kg 群の Rearing は 2 時間値でやや減少し、4 時間値でやや増加した。実験中常に Vehicle L 群より低い値で推移したが、有意差は認められなかった。BPA 1 mg/kg 群の Rearing は実験中ほとんど変化せず、常に Vehicle L 群よりわずかに低い値を示したが、有意差は見られなかった。

Vehicle H 群の Rearing は時間経過とともに増加した。一方、BPA 10 mg/kg 群は初回で Vehicle H 群よりやや高い値を示す傾向 ($P < 0.1$)が見られたが、時間経過とともに減少し、4 時間値では Vehicle H 群より低い値を示す傾向 ($P < 0.1$)が見られた。しかし、Vehicle H 群との間に有意差は認められなかった。

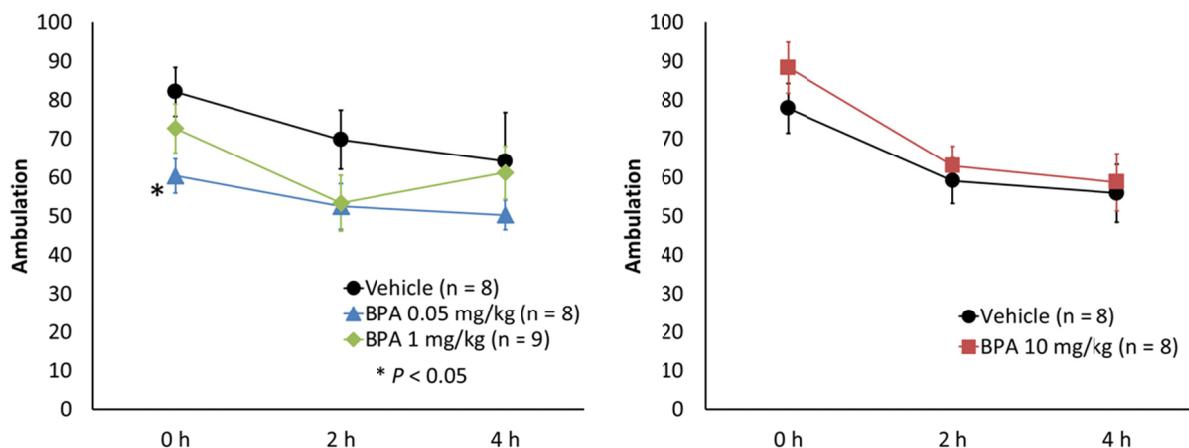


Fig. 2-8. Effect of oral BPA administration on Ambulation (the total number of crossings) during Open-field test in 8-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$. * $P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

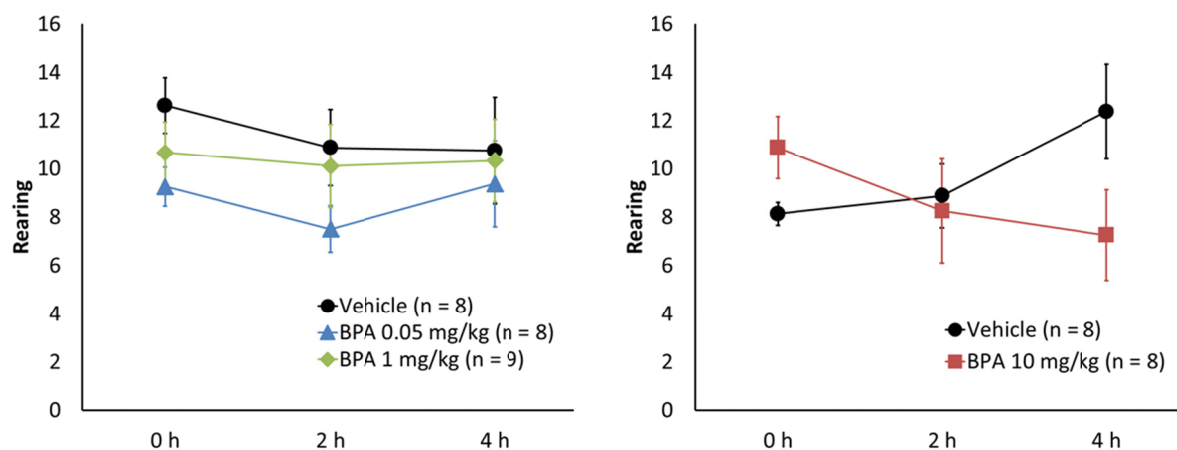


Fig. 2-9. Effect of oral BPA administration on Rearing (frequency of rearing) during Open-field test in 8-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$.

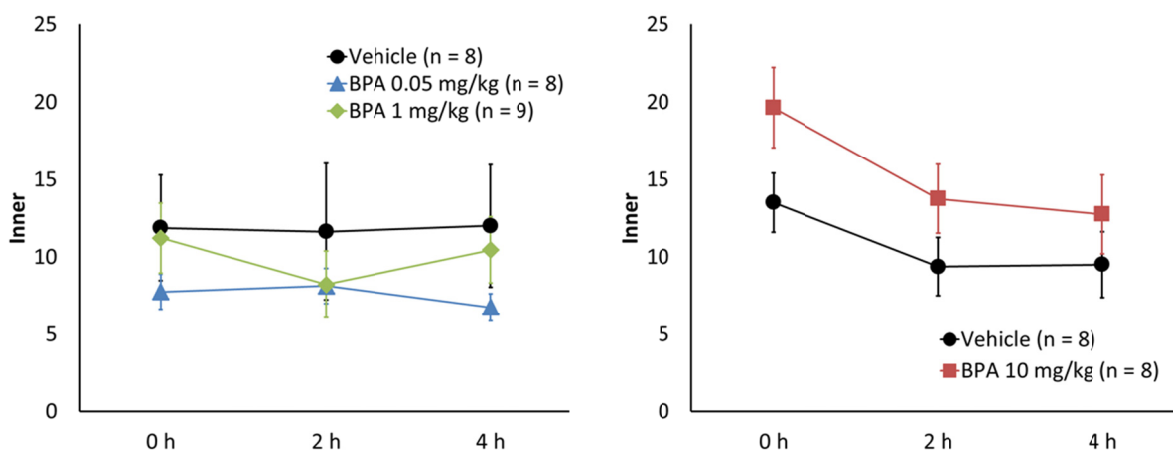


Fig. 2-10. Effect of oral BPA administration on Inner (the number of crossings inside the inner circle) during Open-field test in 8-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: n = 8 each; 1 mg/kg BPA group: n = 9.

Vehicle L 群の Inner は実験中ほとんど変化しなかった。BPA 0.05 mg/kg 群の Inner は Vehicle L 群と同様に実験中ほとんど変化せず、常に Vehicle L 群より低い値を示したが、有意差は見られなかった。BPA 1 mg/kg 群の Inner は 2 時間値でやや減少し、Vehicle L 群より低い値となったが、有意差は認められなかった。

Vehicle H 群および BPA 10 mg/kg 群の Inner は時間経過とともに減少した。BPA 10 mg/kg 群の Inner は初回で Vehicle H 群よりやや高い値を示す傾向 ($P < 0.1$) が認められ、その後も Vehicle H 群より高い値で推移したが、有意差は認められなかった。

2.5 Elevated plus-maze test

Fig. 2-11, Fig. 2-12 は、BPA 0.05 mg/kg、BPA 1 mg/kg、BPA 10 mg/kg および vehicle (1% ethanol/corn oil あるいは 9% ethanol/corn oil) を経口投与された雄性ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 (Fig. 2-11) および滞在時間 (Fig. 2-12) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。

BPA 0.05 mg/kg 群の open arm への進入回数は Vehicle L 群とほぼ同じで、BPA 1 mg/kg 群の open arm への進入回数は Vehicle L 群よりわずかに多かったが、いずれも有意差は認められなかった。BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の closed arm への進入回数は Vehicle L 群と比べてやや多かったが、有意差は認められなかった。

BPA 10 mg/kg 群については、open arm への進入回数は Vehicle H 群と比べて多い傾向 ($P < 0.1$) が認められ、closed arm への進入回数は Vehicle H 群より有意に多かった ($P < 0.05$)。

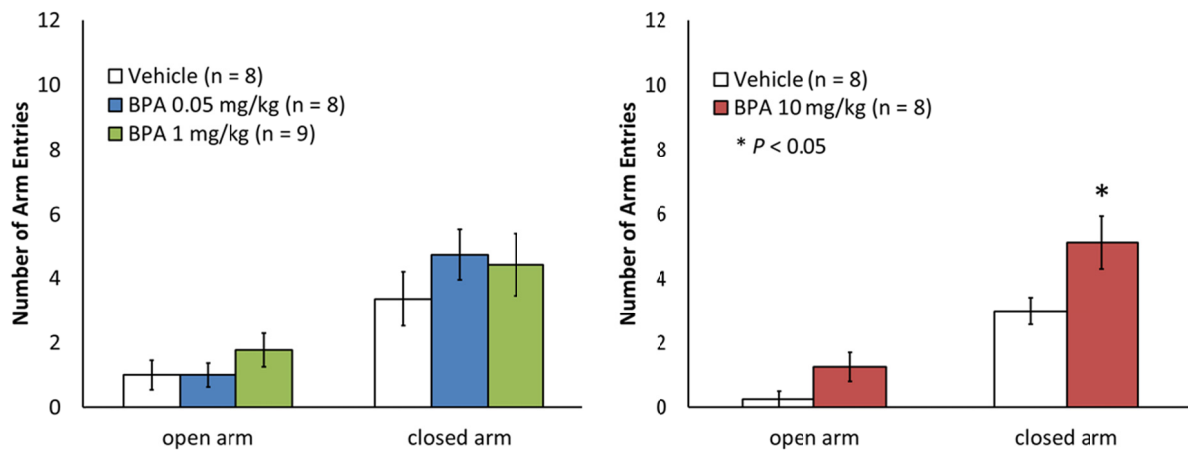


Fig. 2-11. Effect of oral BPA administration on number of arm entries in Elevated plus-maze test in 10-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$. * $P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

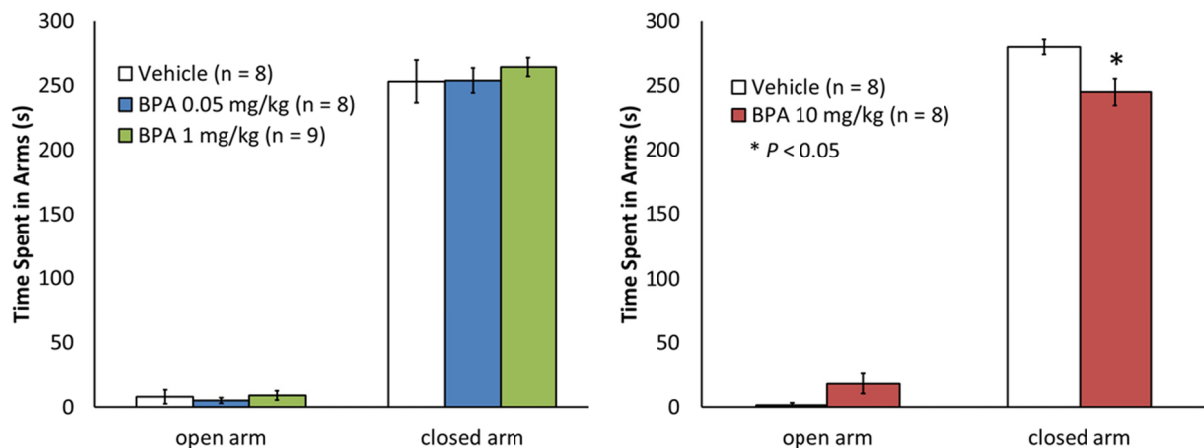


Fig. 2-12. Effect of oral BPA administration on time spent in arms in Elevated plus-maze test in 10-week-old male rats. They were treated with oral BPA administrations (0.05, 1, or 10 mg/kg) or each vehicle (1% ethanol/corn oil or 9% ethanol/corn oil) the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Controls, 0.05 mg/kg BPA group, and 10 mg/kg BPA group: $n = 8$ each; 1 mg/kg BPA group: $n = 9$. * $P < 0.05$ indicates a significant difference from control rats.

BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群の open arm および closed arm における滞在時間は Vehicle L 群とほぼ同じで、有意差は認められなかった。

BPA 10 mg/kg 群については、open arm における滞在時間は Vehicle H 群と比べて長い傾向 ($P < 0.1$)が認められ、closed arm における滞在時間は Vehicle H 群より有意に短かった ($P < 0.05$)。

3. 考察

本研究では、成獣期の BPA 経口投与が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて評価した。

成獣期の BPA 経口投与が雄性ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響を評価するために、第 1 章と同様に MAZE test および Morris water maze test を使用した。

まず、MAZE test において、周産期曝露で雄性ラットの空間学習記憶能を低下させた用量である BPA 0.05 mg/kg、およびその 20 倍の用量である BPA 1 mg/kg の経口投与は、Time および Error に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 2-4, Fig. 2-5)。

この結果を確実なものにするために、さらに高用量の BPA 10 mg/kg 経口投与の行動影響も評価した。この際、より詳細に評価するために、第 1 章で使用した MAZE test に MAZE (D) test を追加した。BPA 10 mg/kg 群は、MAZE (A) test の 2 日目および MAZE (B) test の 1 日目において、Vehicle 群より長い Time を示す傾向が認められ ($P < 0.1$; Fig. 2-4)、MAZE (B) test の 2 日目においては Vehicle 群と比べて有意な Error の増加を示した ($P < 0.05$; Fig. 2-5)。一方、MAZE (C) test および MAZE (D) test においては、BPA 10 mg/kg 群は Vehicle 群より若干短い Time を示した (Fig. 2-4)。さらに、BPA 10 mg/kg 群は、MAZE (C) test の 3 日目および MAZE (D) test の 1 日目に Vehicle 群より少ない Error を示す傾向が認められ ($P < 0.1$)、MAZE (D) test の 3 日目には Vehicle 群と比べて有意な Error の減少を示した ($P < 0.01$; Fig. 2-5)。この結果は、雄性ラットへの BPA 10 mg/kg 経口投与が、MAZE test の初期にはわずかに空間学習記憶能を低下させ、MAZE test の後期には若干空間学習記憶能を向上させる可能性を示唆する。しかし、BPA 10 mg/kg 経口投与による有意な影響が観察された測定項目は Error のみで、MAZE test における空間学習記憶能の主要な指標である Time への有意な影響は観察されなかった。このことから、雄性ラットへの BPA 経口投与は MAZE test における空間学習記憶能にほとんど影響を及ぼさないことが示唆される。

MAZE test と同様に空間学習記憶能の測定に用いた Morris water maze test においては、すべての用量の BPA 経口投与群の Latency は Vehicle 群との間に有意差を示さず、成獣雄性ラットへの BPA 経口投与が Morris water maze test における空間学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 2-6)。

MAZE test と Morris water maze test はどちらも空間学習記憶能を測定する行動試験であるが、本研究では各行動試験における投与のタイミングが異なっている。MAZE test では BPA 経口投与をトレーニングおよびテスト後 30 分以内に行っており、BPA は空間記憶の固定過程に作用するものと考えられるが、Morris water maze test では BPA 経口投与をテストの 30 分前に行い、BPA は空間記憶の獲得過程に作用するものと考えられる。さらに、我々が MAZE test と Morris water maze test で測定した空間記憶のタイプは異なっており、MAZE test では Spatial reference memory を、Morris water maze test では Spatial working memory を測定した。これらのことから、我々は成獣雄性ラットへの BPA 経口投

与が Spatial reference memory の固定や Spatial working memory の獲得など、空間学習記憶能の様々な過程においてほとんど影響を及ぼさなかったと考える。

我々の結果とは対照的に、Jain et al.は成獣雄性ラットへの 28 日間の BPA 2 µg/kg および BPA 20 µg/kg 慢性投与が Morris water maze test における Spatial reference memory を低下させたことを報告した⁴⁶⁾。この報告と我々の結果において異なる評価が生じた要因としては、行動試験における行動目的の違いや投与期間の長さの違いが考えられる。我々は Spatial reference memory への影響を評価するために MAZE test を用いたが、Jain et al.は Morris water maze test を使用した。MAZE test におけるモチベーションはゴールの報酬を得ることであるが、Morris water maze test におけるモチベーションは水難を回避することである。報酬学習と忌避学習には異なるドーパミン神経経路が関与していることが報告されている³¹⁾。さらに、Jain et al.は低用量 BPA への 28 日間の慢性曝露の影響を調べたが、我々は幅広い用量の BPA への短期間の曝露の影響を調べた。

成獣期の BPA 経口投与が雄性ラットの体験型学習記憶能に及ぼす影響に関しては、第 1 章と同様に Step-through passive avoidance test を用いて評価した。

獲得試行では、BPA 10 mg/kg 群において Vehicle 群より長い Latency を示す傾向が認められた ($P < 0.1$) が、すべての用量の BPA 経口投与群において Vehicle 群と比べて有意差は認められなかった (Fig. 2-7)。保持試行では、BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 10 mg/kg 群の Latency は Vehicle 群よりやや長かったが、その影響は有意ではなかった。よって、成獣雄性ラットへの BPA 経口投与が体験型学習記憶能には影響を及ぼさないことが示唆された。

一方、Jain et al.は成獣雄性ラットへの 28 日間の BPA 2 µg/kg および BPA 20 µg/kg 慢性投与が体験型学習記憶能を低下させたことを報告した⁴⁶⁾。この報告とは対照的に、Xu et al.は、BPA 単回投与がエストラジオールと同様に雄性ラットの体験型学習記憶能を向上させたことを明らかにした²⁶⁾。Jain et al.は BPA 慢性曝露の影響を調べたが、我々は Step-through passive avoidance test の獲得試行後の BPA 単回投与の影響を調べており、投与期間の長さが異なっている。また、Xu et al.は出生後 18 日目の幼若雄性ラットを用いて獲得試行の 60 分後の短期受動回避記憶における BPA 単回投与の影響を調べたが、我々は 13 週齢の成獣雄性ラットを用いて獲得試行の 24 時間後の長期受動回避記憶における BPA 単回投与の影響を評価した。これらの違いが、これらの報告と我々の結果において異なる評価が生じた要因であると考えられる。このように、体験型学習記憶能への BPA の影響に関する報告は一貫性に乏しいため、成獣期の BPA 曝露が体験型学習記憶能に及ぼす影響を解明するためには、さらなる研究が必要である。

成獣期の BPA 経口投与が雄性ラットの一般活動性および情動性に及ぼす影響に関しては、第 1 章と同様に Open-field test および Elevated plus-maze test を用いて評価した。

Open-field test において、BPA 0.05 mg/kg 群の Ambulation および Rearing は、Vehicle 群と比べて低い値で推移し、初回の Ambulation は Vehicle 群より有意に少なかった (0 h; $P < 0.05$; Fig. 2-8)。一方、BPA 1 mg/kg 群および BPA 10 mg/kg 群の Ambulation および Rearing においては、Vehicle 群と比べて有意な影響は観察されなかった (Fig. 2-8, Fig. 2-9)。

Inner に関しては、BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群は有意な影響を示さなかったが、BPA 10 mg/kg 群の Inner は高い値で推移し、初回には Vehicle 群と比べて高い値を示す傾向が認められた ($P < 0.1$; Fig. 2-10)。また、Elevated plus-maze test では、BPA 0.05 mg/kg 群および BPA 1 mg/kg 群は測定項目に有意な影響を及ぼさなかったが、BPA 10 mg/kg 群は open arm における進入回数および滞在時間において Vehicle 群と比べて増加を示す傾向が認められた ($P < 0.1$; Fig. 2-11; Fig. 2-12)。さらに、BPA 10 mg/kg 群は closed arm への進入回数の有意な増加および closed arm における滞在時間の有意な減少を示した ($P < 0.05$; Fig. 2-11; Fig. 2-12)。

これらのことから、本研究で使用した BPA の用量のうち最も低用量である BPA 0.05 mg/kg 経口投与が雄性ラットの一般活動性を低下させ、最も高用量である BPA 10 mg/kg 経口投与が軽度の抗不安作用を有することが示唆された。

0.4 mg/kg から 40 mg/kg まで幅広い用量の BPA への慢性曝露が雄性マウスの不安様行動を減少させたという報告⁴⁷⁾があり、この報告は我々の結果と一致している。一方で、高用量 BPA 慢性曝露が雄性マウスの不安様行動を亢進させたという報告⁴⁸⁾や、低用量 BPA への短期間曝露が雌雄ラットの不安様行動を亢進させたという報告⁴⁹⁾もあり、成獣期の BPA 投与がげっ歯類の情動性に及ぼす影響はその投与期間や用量により異なる可能性がある。

したがって、本実験は、成獣期の BPA 経口投与が雄性ラットの空間学習記憶能および体験型学習記憶能にほとんど影響を及ぼさなかったことを示唆する。また、本実験結果より、成獣雄性ラットへの低用量 BPA 経口投与が自発運動活性を低下させることや、高用量 BPA 経口投与が軽度の抗不安作用を示すことも示唆される。

第 3 章

BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの 学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

本章では、第 2 章の成獣雄性ラットにおける空間学習記憶能への BPA の影響評価を確実なものにするために、空間学習記憶に関与する脳領域である背側海馬⁵⁰⁾への BPA 微量注入が成獣雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。雌性ラットへのエストラジオール海馬内微量注入が空間学習能を向上させること⁵¹⁾や、BPA がエストラジオールと同様に海馬における長期抑圧(long term depression:LTD)やスパイン密度を変化させること⁵²⁾が報告されており、海馬は BPA が空間学習記憶能に影響を及ぼす際の主要な作用部位であると考えられる。よって、成獣雄性ラットへの BPA 経口投与の影響を調べた第 2 章の結果と同様に、BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの空間学習記憶能へ影響を及ぼさないことが確認できれば、成獣期の BPA 曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさない結論づけることができる。

BPA 海馬内微量注入の中枢神経機能への影響を検証するために、MAZE test を用いて空間学習記憶能を、Step-through passive avoidance test を用いて体験型学習記憶能を、Open-field test を用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus-maze test を用いて不安様行動を評価した。

1. 実験材料および実験方法

1.1 実験動物

実験には、5 週齢で購入した Sprague Dawley 系雄性ラット (SD ラット: (株)九動) を用いた。温度 22 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 %、12 h/12 h 明暗サイクル (午前 7 時点灯) の動物飼育保管実験室内で、プラスチック製ケージ (縦: 42.0 cm×横: 25.0 cm×高さ: 18.5 cm) にて 1 ケージあたり 2~3 匹の群飼育を行った。

入荷後 1 週間は餌(固形飼料 F2: 船橋農場株式会社)と水(水道水)を自由摂取させ、その後は MAZE test の報酬に対するモチベーションを高めるため、給餌・給水制限(餌: 約 12 g/匹/日、水: 約 33.3 ml/匹/日)を行った。また、過度の体重制限を避けるため、週に 1 度、給餌・給水制限を緩和した。ただし、ガイドカニューレ植え込み手術期間および手術後の回復期間は、餌および水を自由摂取させた。

各投与群間に MAZE test における走行能の差ができる限り生じないように、ガイドカニューレ植え込み手術前に MAZE test の群分けトレーニングを用いて投与群の群分けを行った。

本実験は、すべて長崎大学実験動物規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物は、ビスフェノール A (Bisphenol A : BPA : 和光純薬工業株式会社) を使用した。

BPA は、超純水を用いて調製した 40% プロピレングリコール (Propylene Glycol : PG : 和光純薬工業株式会社) に溶解させ、 $20\text{ }\mu\text{g}/2\text{ }\mu\text{l}$ となるよう調製した。対照群には 40% PG を海馬内微量注入した (Vehicle 群) が、vehicle の PG 濃度は高濃度であったため、vehicle 海馬内微量注入による中枢神経機能への影響を排除するために、別に生理食塩水 (saline : 0.9% NaCl 溶液) 投与群を設けた。

1.3 ガイドカニューレ植え込み手術

ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg 腹腔内注射麻酔下において、ラット頭部をラット用脳固定装置に固定し、歯科用ドリルで頭蓋骨を窄孔した後、König&Klippel の脳図譜⁵³⁾に従って、背側海馬 (脳部位 A : -2.6 mm 、L : $\pm 1.5\text{ mm}$ 、H : 1.9 mm) の 1 mm の上方にガイドカニューレを両側性に植え込んだ。

ガイドカニューレは頭蓋骨に立てた 1 本の小型ネジ釘と共に歯科用セメントで覆い固定した。ガイドカニューレは外径 0.7 mm のステンレススチール製パイプで、長さ 10 mm とした。植え込み手術後は、ガイドカニューレと同じ長さの疑似カニューレ (外径 0.35 mm) を挿入留意して、脳組織内へ異物が混入すること、およびガイドカニューレ内部が詰まることを防止した。

ガイドカニューレ植え込み手術は 8 週齢時に行い、行動実験開始前に 1 週間以上の回復期間を設けた。

1.4 薬物微量注入

被験薬物の海馬内微量注入は、ポリエチレンチューブでマイクロシリンジ (Hamilton syringe) に接続した外径 0.35 mm のステンレススチール製インジェクションカニューレのガイドカニューレへの挿入により行った。インジェクションカニューレの先端はガイドカニューレより 1 mm 先に出るようにした。片側 $2\text{ }\mu\text{l}$ 、両側 $4\text{ }\mu\text{l}$ の薬液を約 2 分間かけて両側海馬に注入した。また、被験薬物注入を確実にするために、注入後 1 分間はインジェクションカニューレをそのまま留置した。

すべての行動実験終了後、クリオスタット (MICROM HM500OM, Carl Zeiss) を用いて厚さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の海馬凍結切片を作製し、ガイドカニューレ挿入部位を確認した。なお、背側海馬に投与できていなかったラットはデータ解析から除外した。

1.5 行動観察

1.5.1 MAZE test

空間学習記憶能の測定には可変式迷路装置 (MAZE : Fig. 1-1) を用いた。

本装置は、 $90\text{ cm} \times 90\text{ cm}$ の正方形に $15\text{ cm} \times 15\text{ cm}$ の正方形が連結した底面となってお

り、高さは 50 cm、内面は白色である。縦×横：50 cm×15 cm、50 cm×30 cm、50 cm×45 cm、50 cm×60 cm の仕切り板を組み合わせ、3 段階の難易度の MAZE [MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C)]を作成した。

装置の底面上 100 cm の高さに 100 W の白色光を 2 台設置し、装置内はくまなく一定の照度が維持されるように調節した。装置内壁上部 4 箇所、形状の異なるシールを貼り、ゴールまでの道筋を記憶する目印として用いた。ゴールには報酬としてミルクを置いた。ミルクは、20 g のコンデンスミルク（雪印乳業株式会社）に 100 ml の水道水を加えたものとした。

MAZE test を行うにあたり、まず装置と報酬への「慣らし」および「群分けトレーニング」を 7 週齢時に行った。次に、各 MAZE において、正解通路を学習記憶させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたって空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。

なお、本実験におけるトレーニングおよびテストでは、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、ゴールに到着してからは報酬を自由に摂取させ、ここまでする 1 trial とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。

被験薬物の投与は、トレーニングおよびテスト後 30 分以内に行われた。

10 週齢時に MAZE (A) test、12 週齢時に MAZE (B) test、14 週齢時に MAZE (C) test をそれぞれ実施した。

① 慣らし

ゴールを塞いだ MAZE 装置を 4 等分に仕切り、1 エリアにつき 1 匹のラットを入れて慣らしを行った (Fig. 1-2)。1 trial を 3 分間とし、その間は装置内を自由に探索させた。報酬はミルク 300 μ l とした。3 trial を 1 session とし、2 時間の間隔をおいて 1 日に 2 session を、連続して 3 日間行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

② 群分けトレーニング

エラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置 (Fig. 2-1)を用いて、3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールに到達できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールに到達し報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

この群分けトレーニングの結果を用いて、できる限り各投与群間で走行能の差が生じないよう群分けを行った。

③ トレーニング

各 MAZE のエラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置を用いて、3 trial を行った。1 trial

の最大測定時間を3分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

④ テスト

各 MAZE 装置 (Fig. 1-3)を用いて、1日3 trial を連続して3日間行った。1 trial の最大測定時間を5分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。5分経過してもゴールに到着できない場合は、棒でラットをゴールまで誘導した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) およびエラーエリアへの進入回数 (Error) とした。Error については、ラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

1.5.2 Step-through passive avoidance test

体験型学習記憶能の測定には Step-through passive avoidance test を用いた。実験装置および実験方法については、第1章の 1.3.5 Step-through passive avoidance test と同様である。本課題は15週齢時に実施し、被験薬物の投与は獲得試行終了後30分以内に行った。

1.5.3 Open-field test

一般活動性および情動性の測定には Open-field test を用いた。実験装置および実験方法については、第1章の 1.3.1 Open-field test と同様である。本課題は10週齢時に実施し、被験薬物の投与は Open-field test の前日に行った。

1.5.4 Elevated plus-maze test

情動性の測定には Elevated plus-maze test を用いた。実験装置および実験方法については、第1章の 1.3.2 Elevated plus-maze test と同様である。本課題は12週齢時に実施し、被験薬物の投与は Elevated plus-maze test の前日に行った。

1.6 統計学的処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。それぞれのテストから得たデータの有意差検定は、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行った後、Dunnett (Stat View 5.0, Microsoft) の多重比較検定を用いて行い、危険率5%以下を有意差有りとした。

1.7 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

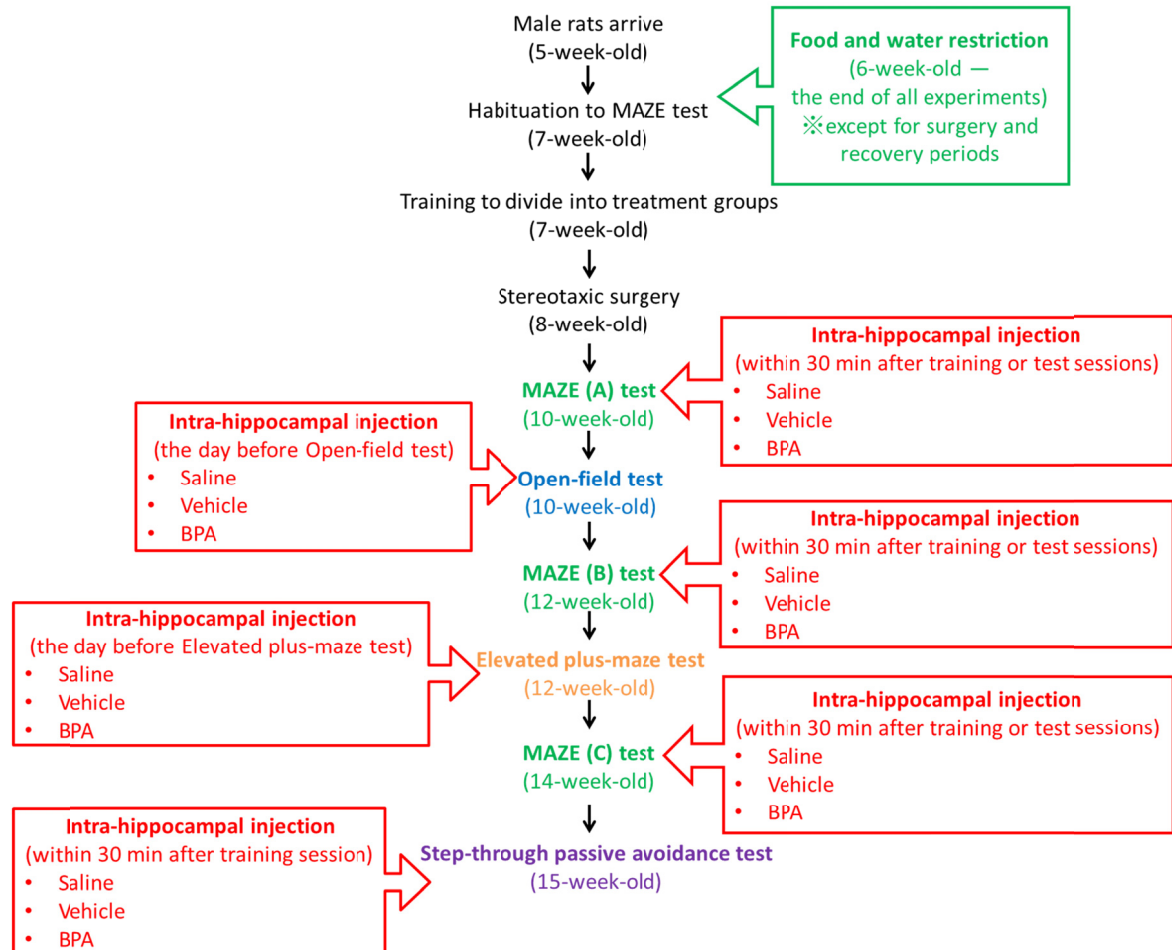


Fig. 3-1. Experimental procedure.

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 3-2, Fig. 3-3 は、BPA、vehicle および saline を海馬内微量注入された雄性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 3-2) および Error (Fig. 3-3) をその平均値±標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。

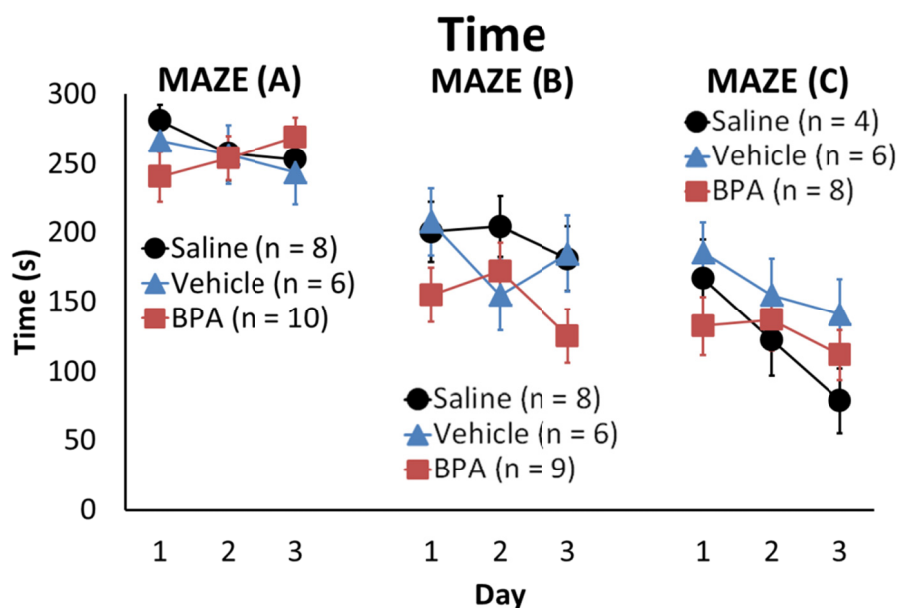


Fig. 3-2. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Time, defined as the latency required to reach the goal and start eating the reward, in MAZE test in 10-, 12-, and 14-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle within 30 min after training or test sessions. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8 in MAZE (A) and (B) tests, and n = 4 in MAZE (C) test; Vehicle group: n = 6 each MAZE test; BPA group: n = 10 in MAZE (A) test, n = 9 in MAZE (B) test, and n = 8 in MAZE (C) test.

MAZE (A) test において、Saline 群および Vehicle 群の Time はほぼ同様の値で推移し、どちらも日数の経過とともに減少した。群間に有意差は見られなかった。一方、BPA 群の Time は日数の経過とともに増加し、1 日目に Vehicle 群よりやや低い値、3 日目に Vehicle 群よりやや高い値となったが、群間に有意差は認められなかった。

MAZE (B) test において、Saline 群の Time は 3 日間ほとんど変化しなかった。Vehicle 群の Time は 2 日目に減少し、Saline 群より低い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群は 1 日目および 3 日目に Vehicle 群より低い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。

MAZE (C) test において、Saline 群および Vehicle 群の Time は日数の経過とともに減少

した。Vehicle 群は 3 日間常に Saline 群より高い値で推移したが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Time は 3 日間ほとんど変化せず、Vehicle 群より常に低い値を示したが、群間に有意差は認められなかった。

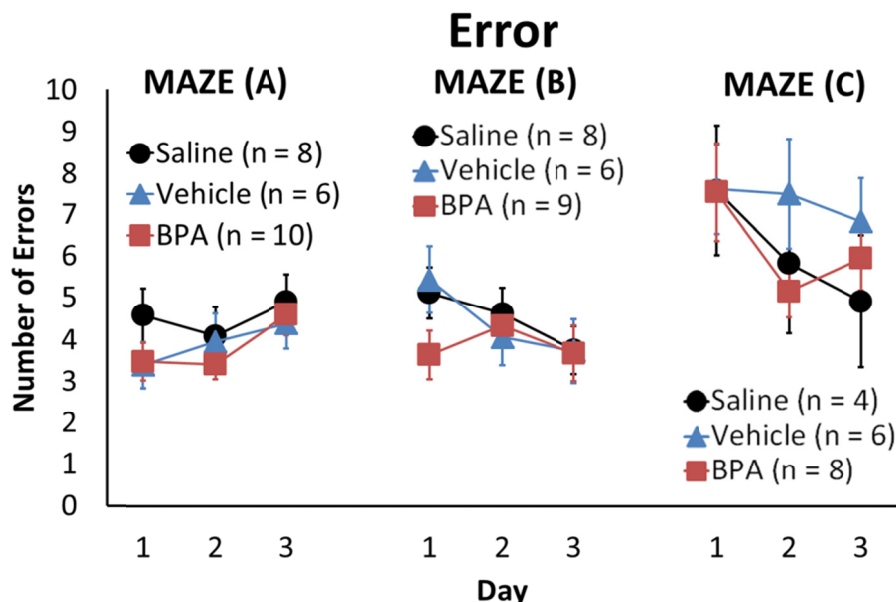


Fig. 3-3. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Error, defined as the number of times the rats entered the error area, in MAZE test in 10-, 12-, and 14-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle within 30 min after training or test sessions. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8 in MAZE (A) and (B) tests, and n = 4 in MAZE (C) test; Vehicle group: n = 6 each MAZE test; BPA group: n = 10 in MAZE (A) test, n = 9 in MAZE (B) test, and n = 8 in MAZE (C) test.

Error に関しては、MAZE (A) test において、すべての群の Error は 3 日間ほとんど変化せず、群間に有意差は認められなかった。

MAZE (B) test において、Saline 群および Vehicle 群の Error はほぼ同様の値で推移し、どちらも日数の経過とともに減少した。群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Error は 3 日間ほとんど変化せず、1 日目に Vehicle 群と比べて低い値を示したが、群間に有意差は認められなかった。

MAZE (C) test において、Saline 群および Vehicle 群の Error は日数の経過とともに減少した。Vehicle 群は 2 日目および 3 日目に Saline 群より高い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Error は 2 日目に減少し、3 日目に増加した。2 日目および 3 日目に Vehicle 群より低い値を示したが、群間に有意差は認められなかった。

2.2 Step-through passive avoidance test

Fig. 3-4 は、BPA、vehicle および saline を海馬内微量注入された雄性ラットの

Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行における Latency をその平均値±標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。

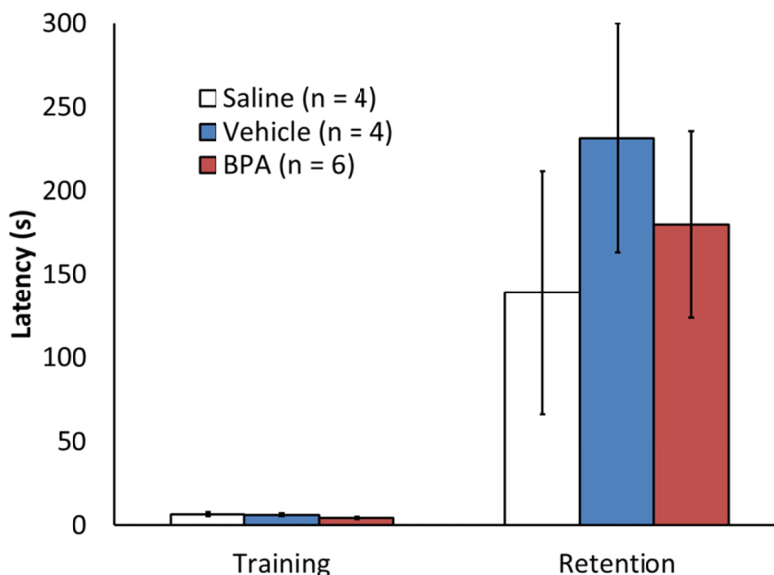


Fig. 3-4. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Latency to enter the dark chamber in Step-through passive avoidance test in 15-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle within 30 min after the training session. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group and Vehicle group: n = 4 each; BPA group: n = 6.

獲得試行において、すべての群の Latency はほぼ同じで、群間に有意差は見られなかった。保持試行においては、Vehicle 群の Latency は Saline 群よりやや長く、BPA 群の Latency は Vehicle 群よりやや短かったが、群間に有意差は認められなかった。

2.3 Open-field test

Fig. 3-5～Fig. 3-7 は、BPA、vehicle および saline を海馬内微量注入された雄性ラットの open-field test における Ambulation (Fig. 3-5)、Rearing (Fig. 3-6)、Inner (Fig. 3-7) をその平均値±標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Rearing は立ち上がり行動の回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数である。

Saline 群および BPA 群の Ambulation は時間経過とともに減少したが、Vehicle 群の Ambulation は 2 時間値で増加し、4 時間値で減少した。Vehicle 群の 2 時間値は Saline 群より高い値となったが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Ambulation は初回で Vehicle 群より高い値となり、2 時間値で Vehicle 群よりやや低い値となったが、群間に有意差は見られなかった。

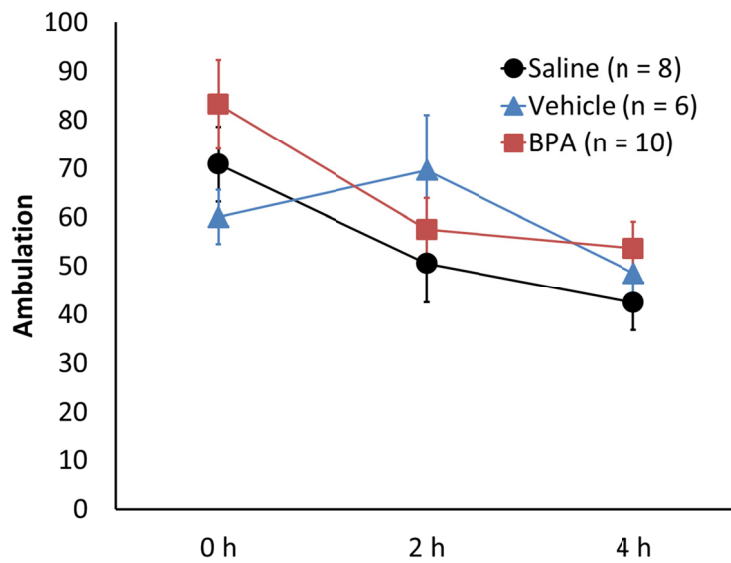


Fig. 3-5. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Ambulation (the total number of crossings) during Open-field test in 10-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8; Vehicle group: n = 6; BPA group: n = 10.

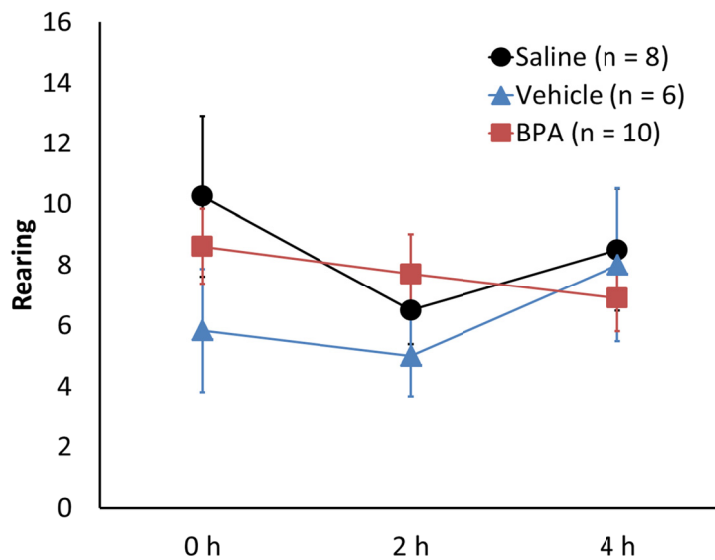


Fig. 3-6. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Rearing (frequency of rearing) during Open-field test in 10-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8; Vehicle group: n = 6; BPA group: n = 10.

Saline 群および Vehicle 群の Rearing は 2 時間値で減少し、4 時間値で増加した。Vehicle

群は実験中常に Saline 群より低い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Rearing は時間経過とともに緩やかに減少した。初回および 2 時間値で Vehicle 群より高い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。

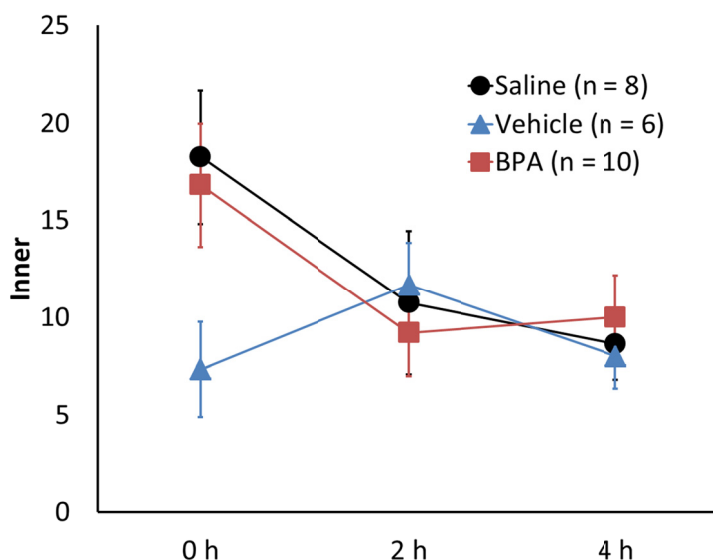


Fig. 3-7. Effect of intra-hippocampal BPA injection on Inner (the number of crossings inside the inner circle) during Open-field test in 10-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8; Vehicle group: n = 6; BPA group: n = 10.

Saline 群の Inner は時間経過とともに減少した。Vehicle 群の Inner は 2 時間値で増加し、4 時間値で減少した。Vehicle 群の初回の Inner は Saline 群より少なかったが、群間に有意差は見られなかった。BPA 群の Inner は 2 時間値で減少し、4 時間値でやや増加した。初回で Vehicle 群より高い値を示したが、群間に有意差は見られなかった。

2.4 Elevated plus-maze test

Fig. 3-8, Fig. 3-9 は、BPA、vehicle および saline を海馬内微量注入された雄性ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 (Fig. 3-8) および滞在時間 (Fig. 3-9) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。

Vehicle 群の open arm への進入回数は Saline 群と比べてやや少なく、BPA 群の open arm への進入回数は Vehicle 群よりわずかに多かったが、群間に有意差は見られなかった。Vehicle 群および BPA 群の closed arm への進入回数は Saline 群より多く、BPA 群と Saline 群の間には有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Vehicle 群の open arm における滞在時間は Saline 群と比べてやや短く、BPA 群の open arm における滞在時間は Vehicle 群より長かったが、群間に有意差は見られなかった。

Vehicle 群の closed arm における滞在時間は Saline 群よりわずかに長く、BPA 群の closed arm における滞在時間は Vehicle 群よりやや短かったが、群間に有意差は見られなかった。

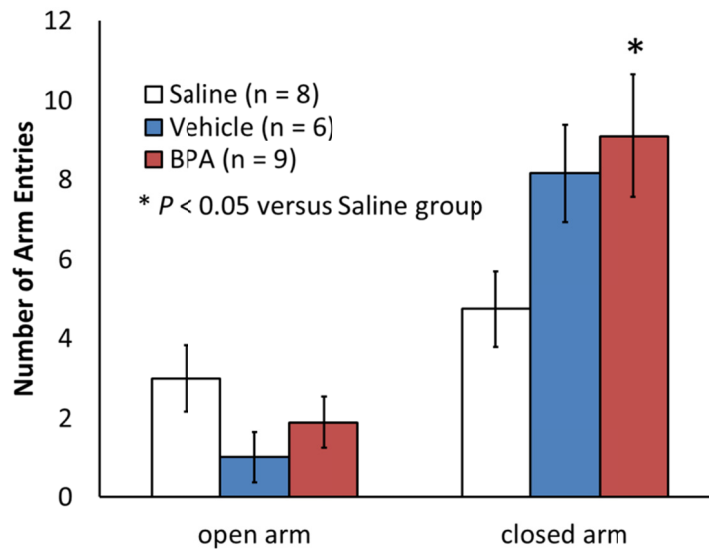


Fig. 3-8. Effect of intra-hippocampal BPA injection on number of arm entries in Elevated plus-maze test in 12-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8; Vehicle group: n = 6; BPA group: n = 9. * P < 0.05 indicates a significant difference from Saline group.

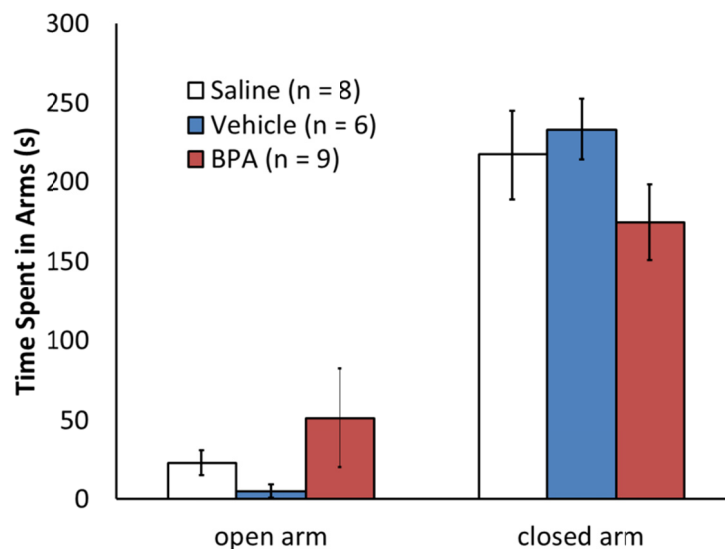


Fig. 3-9. Effect of intra-hippocampal BPA injection on time spent in arms in Elevated plus-maze test in 12-week-old male rats. They received microinjections bilaterally into the dorsal hippocampus of BPA (20 μ g/2 μ l/side), saline, or vehicle the day before the test. The results are expressed as mean \pm S.E.M. Saline group: n = 8; Vehicle group: n = 6; BPA group: n = 9.

3. 考察

本研究では、成獣期の BPA 曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないという第 2 章の研究結果を確実なものにするために、空間学習記憶に関与する脳領域である背側海馬⁵¹⁾への BPA 微量注入が成獣雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて評価した。

今回の実験では、BPA を高濃度の PG 溶液に溶解させているため、溶媒のみを投与する Vehicle 群でも中枢神経機能に影響が出る可能性がある。よって、BPA 投与の影響を正確に評価するために、溶媒のみを投与する Vehicle 群に加えて生理食塩水のみを投与する Saline 群も設定した。

まず、MAZE test を用いて BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響を評価した。Saline 群の Time は、MAZE (A) test および MAZE (C) test において日数の経過とともに短縮し、さらに MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C) と MAZE の難易度が上昇しても MAZE test が進むにつれて短縮した (Fig. 3-2)。Vehicle 群の Time も同様に、MAZE (A) test および MAZE (C) test において日数の経過とともに短縮し、MAZE (A) test から MAZE (B) test への進行に伴う Time の短縮も観察された。MAZE test の Time において、Saline 群と Vehicle 群の間に有意差は認められなかった。BPA 群の Time は各 MAZE test 内であまり変動せず、日数の経過に伴う Time の短縮は見られなかった。しかし、BPA 群でも Vehicle 群と同様に、MAZE (A) test から MAZE (B) test への進行に伴う Time の短縮が観察され、MAZE test における BPA 群の Time と Saline 群および Vehicle 群の間に有意差は認められなかった。Error に関しては、MAZE (A) test および MAZE (B) test において各群間に有意な差は観察されなかった (Fig. 3-3)。MAZE (C) test においても、Vehicle 群の Error は Saline 群よりやや高い値で推移したものの、各群間に有意な影響は認められなかった。これらの結果は、BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないことを示唆し、成獣雄性ラットへの BPA 経口投与が空間学習記憶能に影響を及ぼさないことを示唆した第 2 章の結果と一致していた。

BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの体験型学習記憶能に及ぼす影響に関しては、第 1 章および第 2 章と同様に Step-through passive avoidance test を用いて評価した。

獲得試行および保持試行の Latency において各群間に有意差は見られず、BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 3-4)。この結果は、成獣雄性ラットへの BPA 経口投与が体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことを示唆した第 2 章の結果と一致していた。

BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの一般活動性および情動性に及ぼす影響に関しては、第 1 章および第 2 章と同様に Open-field test および Elevated plus-maze test を用いて評価した。

Open-field test において、Saline 群の Ambulation および Inner は、新奇環境への慣れにより、時間の経過とともに減少した (Fig. 3-5, Fig. 3-7)。一方、Vehicle 群では、このよ

うな時間の経過に伴う Ambulation および Inner の減少は見られなかったが、全測定時間において Saline 群との間に有意差は見られなかった (Fig. 3-5, Fig. 3-7)。BPA 群は、Saline 群と同様に時間の経過に伴う Ambulation の減少を示し、すべての測定項目において Saline 群および Vehicle 群と比べて有意な影響は観察されなかった (Fig. 3-5, Fig. 3-6, Fig. 3-7)。よって、BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの一般活動性には影響を及ぼさないことが示唆される。

Elevated plus-maze test では、BPA 群の closed arm への進入回数は Saline 群と比べて有意に多かった (Fig. 3-8)。しかし、有意差は認められなかったものの Vehicle 群も Saline 群と比べてやや大きい値を示し、BPA 群と Vehicle 群の間には有意差が認められなかった。よって、BPA 群の closed arm への進入回数の増加が BPA の作用によるものであると断言することはできない。しかし、BPA 群が、Saline 群および Vehicle 群と比べて、open arm における滞在時間がやや長く、closed arm における滞在時間がやや短かったことを踏まえると、BPA 海馬内微量注入が成獣雄性ラットの情動性を若干低下させる可能性が示唆される (Fig. 3-9)。この結果は、成獣雄性ラットへの高用量 BPA 経口投与が軽度の抗不安作用を有することを示唆した第 2 章の結果と一致していた。

エストラジオールの海馬内微量注入が、雌性マウスにおいて視覚的記憶固定を向上させたこと⁵⁴⁾や、雌性ラットにおいて空間学習能を向上させたこと⁵¹⁾が報告されている。また、*in vitro* の実験は、BPA がエストラジオールと同様に海馬の CA1 および CA3 において長期抑圧 (long term depression : LTD) を増加させ、CA1 のスパイン密度を増加させたことを明らかにした⁵²⁾。一方で、BPA 単回投与が雄性ラットの CA1 錐体細胞の樹状突起スパイン密度を低下させたという報告²⁵⁾や、BPA 慢性曝露が雄性マウスの海馬において NMDA 型グルタミン酸受容体および AMPA 型グルタミン酸受容体の発現やシナプスタンパク質の発現を低下させたという報告⁴⁷⁾もある。これらのことから、BPA が空間学習記憶能に影響を及ぼす場合には、海馬がその主要な作用部位であると考えられる。

本実験では、空間学習記憶能に関与する脳領域であり、BPA が空間学習記憶能に影響を及ぼす際の主要な作用部位であると考えられる海馬へ BPA を直接投与し、BPA 海馬内微量注入が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないことを示唆した。よって、第 2 章の結果を踏まえて、成獣期の BPA 曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないことが強く示唆された。また、成獣雄性ラットへの BPA 海馬内微量注入が体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことや、情動性を若干低下させる可能性が示唆され、この結果も第 2 章の結果と一致していた。

総括

本研究は、内分泌攪乱化学物質として認知されている BPA への胎児期から新生児期にかけての周産期曝露、および成獣期曝露がそれぞれ雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行い、以下の結果を得た。

- 1) 低用量 BPA 周産期曝露は雄性ラットにおいて、警戒心を低下させたものの、自発運動活性に影響を及ぼすことなく、特異的に空間学習記憶能、特に海馬依存的な **Spatial reference memory** を低下させた。高用量ではこの影響は認められず、BPA 周産期曝露と空間学習記憶能低下の非単調用量反応関係が示唆された。一方、BPA 周産期曝露は体験型学習記憶能には影響を及ぼさなかった。
- 2) 成獣雄性ラットへの低用量 BPA 経口投与は自発運動活性を低下させ、高用量 BPA 経口投与は軽度の抗不安作用を示した。一方で、成獣期の BPA 経口投与は雄性ラットの空間学習記憶能および体験型学習記憶能にはほとんど影響を及ぼさなかった。
- 3) 成獣雄性ラットへの BPA 海馬内微量注入は、情動性を若干低下させる可能性が示唆されたものの、空間学習記憶能および体験型学習記憶能には影響を及ぼさなかった。BPA の投与部位である海馬は、空間学習記憶能に関与する脳領域であり、BPA が空間学習記憶能に影響を及ぼす際の主要な作用部位であると考えられるため、この結果は成獣期の BPA 曝露が雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさないという研究結果を確実なものとする。

以上のことから、BPA は雄性ラットにおいて、胎児期から新生児期にかけての低用量曝露により成長後の空間学習記憶能を低下させるが、脳の発達が完了した成獣期⁵⁰⁾における曝露は空間学習記憶能に影響を及ぼさないということが示唆された。

妊娠期間および授乳期間の低用量 BPA 曝露が、マウスにおいて性的二型核として知られている視床下部の前腹側室周囲核 (AVPV) のチロシン水酸化酵素発現ニューロン数における性差を消失させたという報告⁵⁶⁾や、雌雄ラットの海馬においてミトコンドリアの機能低下を引き起こすことによりニューロンおよびグリア細胞の発達に影響を及ぼすことを示唆した報告⁵⁷⁾がある。これらのことから、胎児期から新生児期にかけての周産期が BPA の神経毒性に脆弱な期間であり、周産期の BPA 曝露が脳の性分化および脳の発達に影響を及ぼすことにより成長後の雄性ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼすと考えられる。

また、本研究では、雄性ラットの空間学習記憶能は BPA 周産期曝露により影響を及ぼされたが、雄性ラットの体験型学習記憶能は BPA への周産期曝露および成獣期曝露により影響を及ぼされなかった。この 2 種類の学習記憶能への BPA の影響における差の要因としては、空間学習記憶能と体験型学習記憶能に関与する脳領域の違いが考えられる。本研究で

評価した体験型学習記憶のような恐怖により動機づけされた学習記憶には、海馬に加えて扁桃体が関与することが分かっている⁵⁸⁾。

本研究では成獣期の雄性ラットへの BPA 投与が学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆されたが、成獣雌性ラットを用いて BPA の影響を検討した研究では、OVX ラットへのエストロゲン投与による学習記憶能向上および海馬のスパイン密度増加を BPA が阻害したことや、内因性エストロゲン濃度が高い発情前期に BPA が学習記憶能を低下させたことが報告されている²⁴⁾。また、雄性ラットにおいてもエストロゲン投与による学習記憶能向上が BPA により阻害されたという報告もある²⁶⁾。よって、BPA の学習記憶能への影響は内因性エストロゲン濃度に依存すると考えられる。

現在、BPA の最小毒性量 (LOAEL) は $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{day}$ とされており、TDI は $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{day}$ に設定されている⁴⁰⁾。しかし、本研究では、TDI である $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{day}$ の用量の BPA に周産期曝露された雄性ラットにおいて空間学習記憶能の低下が認められた。よって、我々は、Welshons et al.⁵⁹⁾が提案しているように BPA の影響評価を見直し、TDI を再検討することの必要性を提言する。また、特に妊婦や発達中の乳幼児に関しては BPA への曝露に注意が必要であると考ええる。

参考文献

- 1) vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2005;113:926–933.
- 2) Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod.* 2002;17:2839–2841.
- 3) Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 2005;113:391–395.
- 4) Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere.* 2007;66:1160–1164.
- 5) Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav.* 2011;59:296–305.
- 6) Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect.* 2011;119:547–552.
- 7) vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health.* 1998;14:239–260.
- 8) Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect.* 2007;115:80–86.
- 9) Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 2004;145:592–603.
- 10) Cagen SZ, Waechter JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, et al. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1999;30:130–139.
- 11) Nagao T, Saito Y, Usumi K, Kuwagata M, Imai K. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reprod Toxicol.* 1999;13:303–311.
- 12) Kwon S, Stedman DB, Elswick BA, Cattley RC, Welsch F. Pubertal development and reproductive functions of cri:CD br Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A

- during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci.* 2000;55:399–406.
- 13) Packard MG. Posttraining estrogen and memory modulation. *Horm Behav.* 1998;34:126–139.
 - 14) Frye CA, Rhodes ME, Dudek B. Estradiol to aged female or male mice improves learning in inhibitory avoidance and water maze tasks. *Brain Res.* 2005;1036:101–108.
 - 15) Gresack JE, Frick KM. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;84:112–119.
 - 16) Harburger LL, Bennett JC, Frick KM. Effects of estrogen and progesterone on spatial memory consolidation in aged females. *Neurobiol Aging.* 2007;28:602–610.
 - 17) Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 2003;45:345–356.
 - 18) Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology.* 2011;61:565–573.
 - 19) Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience.* 2010;167:741–749.
 - 20) Gonçalves CR, Cunha RW, Barros DM, Martínez PE. Effects of prenatal and postnatal exposure to a low dose of bisphenol A on behavior and memory in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;30:195–201.
 - 21) Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QQ. Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-d-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm Behav.* 2010;58:326–333.
 - 22) Zhou R, Bai Y, Yang R, Zhu Y, Chi X, Li L, et al. Abnormal synaptic plasticity in basolateral amygdala may account for hyperactivity and attention-deficit in male rat exposed perinatally to low-dose bisphenol-A. *Neuropharmacology.* 2011;60:789–798.
 - 23) Stump DG, Beck MJ, Radovsky A, Garman RH, Freshwater LL, Sheets LP, et al. Developmental neurotoxicity study of dietary bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2010;115:167–182.
 - 24) Inagaki T, Frankfurt M, Luine V. Estrogen-induced memory enhancements are blocked by acute bisphenol A in adult female rats: Role of dendritic spines. *Endocrinology.* 2012;153:3357–3367.
 - 25) Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V. Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behav Neurosci.* 2012;126:175–

185.

- 26) Xu X, Li T, Luo Q, Hong X, Xie L, Tian D. Bisphenol-A rapidly enhanced passive avoidance memory and phosphorylation of NMDA receptor subunits in hippocampus of young rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;255:221–228.
- 27) Doerge DR, Vanlandingham M, Twaddle NC, Delclos KB. Lactational transfer of bisphenol A in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett.* 2010;199:372–376.
- 28) Miyakoda H, Tabata M, Onodera S, Takeda K. Passage of bisphenol A into the fetus of the pregnant rat. *Journal of Health Science.* 1999;45:318–323.
- 29) Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;255:261–270.
- 30) Jones BA, Watson NV. Perinatal BPA exposure demasculinizes males in measures of affect but has no effect on water maze learning in adulthood. *Horm Behav.* 2012;61:605–610.
- 31) Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron.* 2010;66:896–907.
- 32) Ros-Simó C, Moscoso-Castro M, Ruiz-Medina J, Ros J, Valverde O. Memory impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice. *J Neurochem.* 2013;125:736–746.
- 33) Xu X, Xie L, Hong X, Ruan Q, Lu H, Zhang Q, et al. Perinatal exposure to bisphenol-A inhibits synaptogenesis and affects the synaptic morphological development in offspring male mice. *Chemosphere.* 2013;91:1073–1081.
- 34) Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, Tomizawa H, Sajiki J, Shimizu E. Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice. *Horm Behav.* 2013;63:709–716.
- 35) Fujimoto T, Kubo K, Aou S. Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. *Brain Res.* 2006;1068:49–55.
- 36) vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2056–2061.
- 37) Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* 2004;77:151–157.

- 38) Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology*. 2006;227:185–192.
- 39) Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. The mammary gland response to estradiol: Monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;101:263–274.
- 40) Weiss B: Endocrine disruptors as a threat to neurological function. *J Neurol Sci*. 2011;305:11–21.
- 41) Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, Patisaul HB. Neonatal bisphenol-A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod*. 2009;81:690–699.
- 42) Angle BM, Do RP, Ponzi D, Stahlhut RW, Drury BE, Nagel SC, et al. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): Evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol*. 2013;42:256–268.
- 43) Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33:378–455.
- 44) Sun Y, Nakashima MN, Takahashi M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of bisphenol A in rat brain by microdialysis and column switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 2002;16:319–326.
- 45) Tanabe N, Yoshino H, Kimoto T, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Shimohigashi Y, et al. Nanomolar dose of bisphenol A rapidly modulates spinogenesis in adult hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351:317–325.
- 46) Jain S, Kumar CH, Suranagi UD, Mediratta PK. Protective effect of *N*-acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:1404–1409.
- 47) Xu X, Liu X, Zhang Q, Zhang G, Lu Y, Ruan Q, et al. Sex-specific effects of bisphenol-A on memory and synaptic structural modification in hippocampus of adult mice. *Horm Behav*. 2013;63:766–775.
- 48) Luo G, Wei R, Niu R, Wang C, Wang J. Pubertal exposure to bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:177–180.

- 49) Diaz Weinstein S, Villafane JJ, Juliano N, Bowman RE. Adolescent exposure to bisphenol-A increases anxiety and sucrose preference but impairs spatial memory in rats independent of sex. *Brain Res.* 2013;1529:56–65.
- 50) Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: Dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur J Neurosci.* 1990;2:1016–1028.
- 51) Zurkovsky L, Brown SL, Boyd SE, Fell JA, Korol DL. Estrogen modulates learning in female rats by acting directly at distinct memory systems. *Neuroscience.* 2007;144:26–37.
- 52) Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, et al. Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Res Rev.* 2008;57:363–375.
- 53) König JFR, Klippel RA. The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. New York: Krieger; 1967.
- 54) Fernandez SM, Lewis MC, Pechenino AS, Harburger LL, Orr PT, Gresack JE, et al. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci.* 2008;28:8660–8667.
- 55) Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013;106-107:1–16.
- 56) Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology.* 2006;147:3681–3691.
- 57) Kunz N, Camm EJ, Somm E, Lodygensky G, Darbre S, Aubert ML, et al. Developmental and metabolic brain alterations in rats exposed to bisphenol A during gestation and lactation. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29:37–43.
- 58) Phelps EA. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14:198–202.
- 59) Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. Iii. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 2006;147:S56–69.

謝辞

本論文は筆者が長崎大学大学院 生産科学研究科 環境科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究結果をまとめたものである。同専攻教授 山下樹三裕先生には指導教官として本研究の遂行に関して終始ご指導をいただきましたこと、ここに深謝の意を表します。

長崎大学 環境科学部教授 北村美江先生、岡田二郎先生には副査として本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。また、実験の遂行にあたりご協力をいただいた山下研究室の皆さんに深謝の意を表します。